Experimentelle Studien zur Kenntnis der Glyoxalase.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät der Philipps-Universität zu Marburg/Lahn

vorgelegt von

Helmut Nafziger

aus Köln a. Rhein

Marburg 1937

Buchdruckerei Franz Fischer, Kugelgasse 1 (am Kalbstor)

Von der Philosophischen Fakultät der Universität Marburg
als Dissertation angenommen am 28. Januar 1937

Berichterstatter: Prof. Dr. *Meerwein*

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Februar 1937

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Uebersicht.

A. Einleitung. Seite

I. Die beiden Wege des Kohlehydrat-Abbaues 5

II. Die Rolle des Glutathions bei der Glyoxalase-Wirkung . . . 7

B. Versuchsresultate.

I. Die Darstellung gereinigter und haltbarer Glyoxalase-Präparate 11

II. Die Hemmung der Glyoxalase durch Organo-Selenverbindungen 12

III. Die Beeinflussung der Glyoxalase durch die Vitamine C und B_1 14

IV. Ueber den Mechanismus der Glyoxalasewirkung sowie über die Rolle des Flavin-Enzyms 16

V. Die Co-Zymase und ihre Beziehung zu den Wirkgruppen der Teilenzyme 23

C. Versuchsteil.

1) Messmethode 25

2) Berechnung der Ergebnisse 28

3) Ferment-Präparate 31

4) Darstellung von Methylglyoxal 33

5) Darstellung der Selen-Verbindungen 33

6) Hemmungsversuche mit Selen-Verbindungen 35

7) Autoxydations-Versuche an Glutathion und Ascorbinsäure . . 36

8) Ascorbinsäure und Glyoxalase 40

9) Vergleichende Aktivitäts-Bestimmungen 43

10) Glyoxalase und Flavin-Enzym 48

11) Glyoxalase-Aktivität des gelben Fermentes 49

12) Hemmung durch Schwermetalle 51

13) Wirkung der Co-Zymase 52

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554427_0087

Einleitung.

Die beiden Wege des Kohlehydratabbaues.

Die Glyoxalase oder „Ketonaldehydmutase" katalysiert die Umwandlung von 1,2-Ketonaldehyden in Gegenwart von Glutathion zu α-Oxycarbonsäuren[1]). Als natürliches Substrat muss das Methyl-glyoxal angesehen werden, das am schnellsten umgesetzt wird. Grosse Bedeutung hat das Ferment für den Kohlehydratabbau wo das Methyl-glyoxal als Zwischenprodukt der glykolytischen Hexosespaltung auftritt.

Für die Glykolyse, das heisst die Milchsäurebildung aus Kohlehydrat, kommen nach den heutigen Kenntnissen vor allem zwei Wege in Betracht. Der eine führt, von Glykogen ausgehend, über Hexose-phosphorsäure-ester, Triose-phosphorsäuren (Glycerin-aldehyd-phosphorsäure, Phospho-glycerinsäure, Phospho-brenztraubensäure) zur Milchsäure; er ist in der Literatur als *Embden-Meyerhof*sches Schema bekannt[2]) (I. Abbauweg). Der andere zuerst von *Neuberg*[3]) beschriebene Weg verläuft, anscheinend ohne Phosphorylierungsvorgänge über Methyl-glyoxal als Zwischenstufe und nimmt seinen Ausgang immer von Glukose, niemals von Polysaccharid (II. Abbauweg).

Jeden dieser Abbauwege hat man eine Zeitlang als den einzigen, biochemisch in Frage kommenden, ansehen wollen. Heute kann jedoch als sicher gelten, dass beiden die gleiche Bedeutung zukommt.

Als Erste konnten *Aubel* und *Simon*[4]) wahrscheinlich machen, dass beide Wege nebeneinander vorkommen. Danach ist im

1) *Neuberg* und *Simon*, Bio. Z. **256**, 485 (1932).
2) *Embden* und *Jost*, H. S. **230**, 69 (1934).
3) *Neuberg* und *Kobel*, Bio. Z. **207**, 232 (1929).
4) *Aubel* und *Simon*, Bio. Z. **276**, 309 (1935.)

frischen Muskel das Embdenschema verwirklicht: Hexose-diphosphorsäure (HDP) wird gespalten; es tritt Brenztraubensäure auf, aber Methyl-glyoxal ist nicht nachzuweisen. Glycerinphosphat und Pyruvinat reagieren miteinander unter Bildung von Milchsäure. Im Trockenmuskel und im Thunberg-Extrakt wird aus glycerophosphorsaurem Natrium keine Milchsäure gebildet, wohl aber noch aus Hexose-di-phosphat. Im letzteren Falle lässt sich Methyl-glyoxal nachweisen; hier liegt also der II. Abbauweg vor. Aehnliche Verhältnisse findet man beim Gehirngewebe, von dem, nach den Angaben *Ashfords*[5]), Glukose einerseits, Glykogen, Hexose-mono-phosphat (HMP) und HDP andererseits von verschiedenen Fermenten gespalten werden. Die Enzymreaktionen verlaufen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Glukose und einem Vertreter der anderen Gruppen ungestört und unabhängig nebeneinander her; die Gesamtglykolyse ist gleich der Summe der Einzelglykolysen.

Aus den Arbeiten *Geigers*[6]) geht hervor, dass ausser im Muskel und Gehirn in vielen anderen Gewebsarten Kohlehydrate auf zweierlei Weise gespalten werden, wenn auch im einzelnen eine von beiden Reaktionen stark überwiegen kann. Während der Abbau in der Skelettmuskulatur fast ausschliesslich nach *Embden-Meyerhof* verläuft, geht er in Herz, Lunge, Hirn, Retina und glatter Muskulatur vorwiegend nach *Neuberg;* in Niere dagegen und Milz sind beide Abbauwege gleich stark ausgebildet[7]).

Sowohl Brenztraubensäure wie Methyl-glyoxal konnten in glykolysierendem Material nachgewiesen werden[8]). Doch kann der Nachweis von Methyl-glyoxal allein nicht mehr als Beweis für das Vorliegen des II. Abbauweges gelten, seitdem *Fischer* und *Baer*[9]) gezeigt haben, dass es aus Glycerin-aldehyd-phosphorsäure durch Hydrolyse und Wasserabspaltung entstehen kann.

5) *Ashford*, Biochem. J. **27**, 903 (1933); vgl. auch *Johnson*, C. **1936**, I, 3360; *Haarmann* und *Brink*, C. **1936**, I, 2385.

6) *Geiger*, Biochem. J. **29**, 811 (1935).

7) *Haarmann*, Bio. Z. **255**, 203 (1932).

8) *Case* und *Cook*, Biochem. J. **25**, 1319 (1931).

9) *H. O. L. Fischer* und *Baer*, B. **65**, 337 (1932).

Allgemein gilt, dass Gewebe mit hohem Glykogenumsatz, wie quergestreifte Muskulatur, Leber, Erythrocyten, zwar HDP, aber kaum unveresterte Glukose angreifen, während die Glukose leicht spaltenden, wie Tumorgewebe und Netzhaut, Polysaccharid und Hexose-phosphorsäure-ester nur sehr langsam verarbeiten. So bildet Carcinomgewebe bis zu 12% des Eigengewichtes an Milchsäure in einer Stunde[10]), Retina sogar bis zu 35%[11]), wenn Glukose als Substrat dient. In beiden Fällen erwies sich Glykogen als ungeeignet zur Milchsäurebildung. Die graue Substanz des Gehirns setzt Glukose mehr als 30mal schneller um als Glykogen[12]). Für Rückenmark ist das Verhältnis von derselben Grössenordnung.

Die Glyoxalase scheint in den Geweben, die vorzugsweise Glykogen zur Milchsäure abbauen, eine Notfallsfunktion zu besitzen. Wird hier durch irgend eine Störung des I. Abbauweges das giftige Methyl-glyoxal gebildet, so zwingt das Glyoxalase-system auch diesem C_3-Körper die Umwandlung zur Milchsäure auf.

Die Rolle des Glutathions bei der Glyoxalasewirkung.

Für die Wirksamkeit der Glyoxalase ist die Anwesenheit von Glutathion in der reduzierten Form unerlässlich[13]). Die glykolytische Spaltung der Glukose ist ebenso an die Gegenwart dieses Thiols gebunden. Glutathionfrei dialysierte Extrakte bilden weder aus Methyl-glyoxal noch aus Glukose Milchsäure.

Es zeigte sich, dass die Gewebe mit einer hohen Glyoxalase-Wirksamkeit auch in besonderem Masse zur Milchsäurebildung aus Glukose befähigt sind. In beiden Fällen lässt sich die Aktivität durch zugesetztes SH-Glutathion steigern[14]). Der einzige bekannte Weg der Milchsäurebildung, der sich durch Glutathion aktivieren lässt, führt aber über das Methyl-glyoxal, sodass es sehr wahrscheinlich ist, dass auch die Hexosespaltung über dieses Zwischenprodukt erfolgt.

---

10) *Warburg*, Klin. Wochenschr. 4, S. 12 (1925).
11) *Warburg, Posener* u. *Negelein*, Bio. Z. 152, 309 (1924).
12) *Löbel*, Bio. Z. 161, 228 (1925); vgl. *Meyerhof*, Bio. Z. 178, 462 (1926).
13) *Lohmann*, Bio. Z. 254, 332 (1932).
14) *Gaddie* u. *Stewart*, C. 1936, I. 3714.

Wird das Glutathion auf irgend eine Weise ausgeschaltet, dann kann das aus den C_6-Körpern entstehende Methyl-glyoxal nicht weiter verarbeitet werden. Dem entsprechend findet man mit Jodessigsäure eine Hemmung der Glyoxalase[15]) wie der Glykolyse[16]). Jodacetatvergiftete Ansätze bilden keine Milchsäure mehr, sondern häufen Methyl-glyoxal an[17]). Wenn bei der Darstellung von Organ-Trockenpräparaten das Glutathion ganz oder zum grössten Teil entfernt wird oder durch Oxydation unwirksam gemacht ist, findet bei der Einwirkung der in ihnen enthaltenen Fermente auf Glukose beziehungsweise Hexose-di-phosphat eine Ansammlung von Methyl-glyoxal statt, obwohl dieselben Präparate nach der Ergänzung mit SH-Glutathion noch gut als Glyoxalase brauchbar sind[18]).

Ein Teil des so beobachteten Methyl-glyoxals jedoch wird sicher Zwischenprodukten des Embden-Abbaues entstammen. Denn dieses Enzymsystem wird durch Eingriffe, wie Trocknen mit Aceton, geschädigt. Jodacetat im Besonderen verhindert die Dismutationen[19]) und führt demzufolge zu einer Anhäufung von Glycerinaldehyd-phosphorsäure, die ja durch hydrolytischen Zerfall (auch auf nichtenzymatischem Wege) Methyl-glyoxal liefert. Dies ist vor allem zu beachten, wenn Hexose-di-phosphorsäure-ester als Substrate Verwendung fanden.

Die Glykolyse nach *Embden-Meyerhof* ist von einem lebhaften Phosphatumsatz begleitet[20]) und wird daher durch Adenosintri-phosphorsäure und durch organisches Phosphat beschleunigt[21]). Glutathionzusatz ist ohne jede Wirkung, und G·SH-frei dialysierter Muskelextrakt ist zu unverminderter Glykogenspaltung befähigt. Da sich der Abbau der Glukose ohne Phosphory-

---

15) *Dudley*, Biochem. J. **25**, 439 (1931).

16) *Lohmann*, Bio. Z. **236**, 444 (1931); *Lundsgaard*, Bio. Z. **217**, 162 (1930).

17) *Barrenscheen u. Braun*, Bio. Z. **231**, 144 (1931).

18) *Neuberg, Kobel, Laser*, Z. f. Krebsf. **32**, 92 (1930).

19) *Embden u. Deuticke*, H. S. **230**, 50 (1934).

20) *Embden u. Lawaczeck*, Bio. Z. **127**, 181 (1922); Klin. Wochenschr. **3**, 1393 (1924).

21) *Mibroy, Beattie u. Lyle*, J. exp. Phys. **23**, 55 (1933).

lierungsvorgänge abspielt[22]), ist ein Zusatz von ATP hier bedeutungslos für die Glykolysegeschwindigkeit.

Der Umsatz des Methyl-glyoxals zu Milchsäure ist hoch (90—100 %) und läuft ebenso schnell ab wie die Glykolyse nach dem I. Abbauweg[23]). Da das pH-Optimum ebenso breit oder noch breiter[24]) ist, bestehen keine Bedenken, das Methyl-glyoxal als ein Zwischenprodukt des glykolytischen Abbaues anzunehmen. Die meisten Stoffe, welche die Glyoxalase hemmen, beeinflussen die Glykolyse im gleichen oder noch stärkerem Ausmasse. Fluorid hemmt nur die Glykolyse nach *Embden-Meyerhof*[25]). Durch Sauerstoff lässt sich der Umsatz auf beiden Abbauwegen hemmen, und zwar gehen die Abnahmen der Wirksamkeiten parallel[26]). Die Glykolyse wird ausserdem durch das bei der Oxydation auftretende Disulfid-Glutathion (GSSG) gehemmt.

Die Glyoxalase konnte nach ihrer fast gleichzeitigen Entdeckung durch *Neuberg*[27]) und *Dakin*[28]) in fast allen lebenden Materialien aufgefunden werden, ein Umstand, der bei der zentralen Stellung des Kohlehydrat-Abbaues im Gesamtstoffwechsel der Organismen wohl auch als ein Hinweis dafür gewertet werden darf, dass Methyl-glyoxal normalerweise beim Abbau der Hexosen auftritt.

Bemerkenswert ist schliesslich noch die Möglichkeit, das System der alkoholischen Zuckerspaltung durch zugesetztes Glutathion auf reine Milchsäuregärung umzuschalten[29]). Hefe, die durch plasmolytische Schädigung des Enzymsystems der alkoholischen Gärung zur Anhäufung von Methyl-glyoxal gebracht worden ist, bildet bei Anwesenheit von Glutathion kein Methylglyoxal mehr, sondern praktisch reine d(-)-Milchsäure.

---

22) *Ashford* u. *Holmes*, Biochem. J. **23**, 748 (1929).

23) *Jowett* u. *Quastel*, Biochem. J. **28**, 162 (1934).

24) *Kuhn* u. *Heckscher*, H. S. **160**, 116 (1926).

25) *Lohmann*, Bio. Z. **265**, 33 (1933).

26) *Jowett* u. *Quastel*, Biochem. J. **27**, 903 (1933).

27) *Neuberg*, Bio. Z. **51**, 484 (1913).

28) *Dakin* u. *Dudley*, J. biol. Chem. **14**, 155 (1913).

29) *Auhagen* u. *Neuberg*, Bio. Z. **264**, 452 (1933).

Aus all diesen Befunden ist zu schliessen, dass Glukose und Glykogen auf verschiedenen Wegen in Milchsäure aufgespalten werden. Zum Abbau der Glukose ist Glutathion notwendig, Methyl-glyoxal eine wichtige Durchgangsstufe; Phosphorylierungen spielen keine Rolle. Hiervon unterscheidet sich grundsätzlich die Spaltung des Glykogens durch seine Unabhängigkeit von der Gegenwart des SH-Glutathions, die Notwendigkeit von Adenosin-phosphorsäuren und Co-Zymase, sowie durch den Bedarf an anorganischem Phosphat.

Versuchsresultate.

Die Darstellung gereinigter und haltbarer Glyoxalasepräparate.

Ueber die chemische Natur der Glyoxalase war bisher nichts bekannt. Eigene Beobachtungen zeigten, dass das Enzym durch Umfällung mit Aceton und Alkohol als leicht wasserlösliches hochaktives Präparat angereichert werden kann. Vermutlich sind die Wirkgruppen an einen niedermolekularen Eiweisskörper als Träger gebunden. Dies geht aus den Löslichkeitsverhältnissen hervor. Man kann nämlich bei Organ-Trockenpulvern nach Ausziehen mit Wasser den grössten Teil der Aktivität im Extrakt wiederfinden, während das Ungelöste sich als mehr oder weniger inaktiv erweist. So sank durch anderthalbstündige Extraktion die Wirksamkeit eines Acetonmuskels auf weniger als den dritten Teil. Der Extrakt war aber fast 2,5 mal so aktiv wie der Rückstand (bezogen auf das angewandte Ausgangsmaterial) *).

Tabelle 1.

Ferment-Präparat	Acetonmuskel (Meerschweinch.)	Acetonmuskel Meerschweinchen 1,5 Std. extr.	Extrakt aus Meerschweinch.-Acetonmuskel
Reaktions-Geschwindigkeit $mm^3/min.$	7,1	2,2	10,0
angewandte Substanzmenge: mg	20	20	40
Aktivität: $\frac{mm^3/min}{mg}$	0,36	0,11	0,25
Aktivität: $\frac{mm^3/sec}{g}$	6,0	1,8	4,2

In Uebereinstimmung mit Befunden von *Lohmann*[13]) erhält man durch mehrfaches Umfällen Dauerpräparate, die sich ohne Rückstand in Wasser lösen. Die Löslichkeitssteigerung ist von einer Erhöhung der Aktivität begleitet:

*) Ueber die Methode der Aktivitätsbestimmung unterrichtet der Versuchsteil.

Tabelle 2.

Präparat	Extrakt aus Schweineleber	1. Umfällung (Aceton)	2. Umfällung (Alkohol)
Ungelöster Rückstand	90%	50%	20%
Aktivität I (unverdünnt)	0,7	2,5	3,0
Verdünnung	10 fach	5 fach	10 fach
Aktivität II (verdünnt)	2,8	5,6	11

In einem anderen Falle (Extrakt aus Trockenmuskel) wurde ein vollkommen lösliches, schwachgelbliches Pulver erhalten, das fast die 12fache Wirksamkeit des ursprünglichen Präparates besass.

Aehnlich verhalten sich fraktionierte Alkoholfällungen aus Hefe-Autolysat. Hier ist die Wirksamkeit der zweiten Fraktion für eine 90 Minuten lange Beobachtungszeit mehr als doppelt so gross wie die der ersten. Für das letzte Viertel übertrifft sie diese sogar um das Dreifache.

Hieraus ergibt sich für eine zukünftige Untersuchung die Möglichkeit, die chemische Natur des Enzyms an gereinigtem Material und nicht wie bisher nur an Extrakten zu studieren.

Die Hemmung der Glyoxalase durch Oganoselenverbindungen.

Die Rolle des Glutathions als Aktivator der Glyoxalase ist spezifisch und weder durch andere Schwermetall-Komplexbildner im allgemeinen, noch durch andere Thiolverbindungen im besonderen zu ersetzen. Seine Bedeutung liegt in einer Substrat-Aktivierung[30]). Wie zuerst durch jodometrische Titration der Sulfhydrylgruppen gefunden wurde[31]), reagiert Glutathion in wässeriger Lösung bis zu einem schnell sich einstellenden Gleichgewicht mit Methyl-glyoxal unter Abnahme der Zahl seiner HS-Gruppen. Die gebildete Verbindung konnte isoliert werden[32]). Sie bestand aus äquimolaren Mengen Methylglyoxal und Glutathion und kryoskopische Messungen zeigten,

30) *Bersin*, Erg. Enz. Forschg. **4**, 68 (1935).
31) *Girsavicius* und *Heyfetz*, Bio. Z. **276** 190 (1935).
32) *Schubert*, J. biol. Chem. **111**, 671 (1935).

dass sie monomer war[33]). Alle diese Befunde stehen mit der Annahme in Einklang, dass das Reaktionsprodukt die Konstitution eines Halbmercaptals besitzt, dem folgende Formel zuzuschreiben ist:

$$\begin{array}{l} HO \cdot OC \cdot (NH_2)CH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot OH \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \cdot \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad CH_2 \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \cdot \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad S \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \cdot \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad CH_3 \cdot CO \cdot CH \cdot OH \end{array}$$

Es ist als das eigentliche Substrat der Glyoxalase zu betrachten.

In Uebereinstimmung hiermit erhält man mit allen Substanzen, die das Glutathion als Ganzes zerstören[34]) oder seine SH-Gruppe angreifen[35]), eine Hemmung oder völlige Inaktivierung der Glyoxalase. Mit seleniger Säure reagiert beispielsweise Glutathion zu gelb gefärbtem Selenimercaptid[36]), das in alkalischer Lösung in SS-Glutathion und Selenomercaptid zerfällt:

$$4\,G \cdot SH + SeO_2 \rightarrow Se(SG)_4 \rightarrow GS \cdot SG + Se(SG)_2$$

Durch Hydrolyse — besonders leicht in alkalischem Medium —, wird das Selenomercaptid zerlegt in SH-Glutathion und Selenmonoxyd. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird das Letztere wieder zu seleniger Säure oxydiert, wahrscheinlich nach der Disproportionierung des Dimeren über rotes Selen als Zwischenstufe:

$$Se(SG)_2 \rightarrow 2\,G \cdot SH + SeO$$

$$2\,SeO \rightarrow Se_2O_2 \rightarrow SeO_2 + Se$$

Man erhält auf diese Weise eine katalytische Beschleunigung der Autoxydation des G·SH, das in ganz reinem Zustand von Sauerstoff nicht angegriffen werden soll[37]).

Im Hinblick auf ältere Versuche über die anticarcinogene Wirkung von Selenverbindungen[38]), die vermutlich auf Glyoxalase-

33) *Bersin*, B. **69**, 560 (1936).

34) *Schroeder, Munro* und *Weil*, J. biol. Chem. **110**, 181 (1935).

35) *Dickens*, Nat. **131**, 130 (1933).

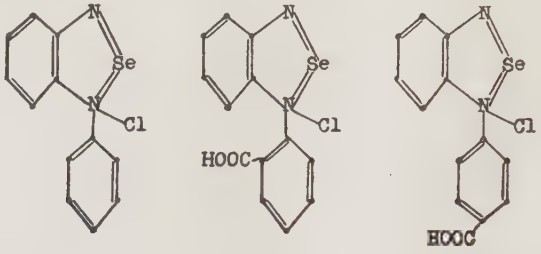
36) *Bersin* und *Logemann*, A. **505**, 1 (1933).

37) *Dixon* und *Meldrum*, Biochem. J. **24**, 472 (1932).

38) *Wassermann, Keyser* u. *Wassermann*, D. Med. Woch. **37**, 2389 (1911); *Coenen* u. *Schulemann*, D. Med. Woch. **41**, 1213 (1915); *Lilienfeld*, C. 1924, I, 2451; *Roffo* u. *Correa*, Z. f. Krebsf. **23**, 82 (1926).

hemmung zurückzuführen ist, habe ich einige organische Selenverbindungen neu hergestellt und ihre Wirkung im Glyoxalaseversuch studiert.

Zur Verwendung kamen Phenyl-piaselenazonium-chlorid (I), das Chlorid der Phenyl-piaselenol-o′-carbonsäure (II) und der Phenyl-piaselenol-p′-carbonsäure (III).



I II III

Diese Körper unterbinden in Ansätzen der Glyoxalase die enzymatische Milchsäurebildung vollkommen, wie die folgende Tabelle am Beispiel des Phenyl-piaselenol-chlorids (I) zeigt.

Tabelle 3.

Puffer: 0,04-m Natriumbicarbonat/5 % CO_2 in N_2
Temperatur: 36°
Ferment: Aceton-Trockenmuskel (Meerschweinchen)

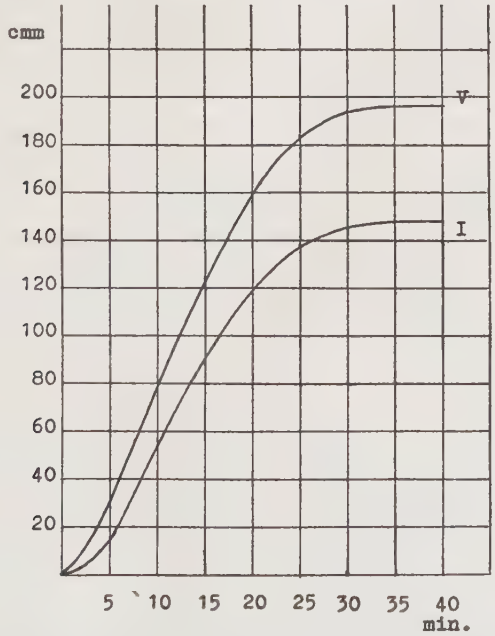
Muskelpulver 20 mg	Muskelpulver 20 mg	Muskelpulver 20 mg	Muskelpulver 20 mg	
	Methgl. 2 mg G · SH m/380	Methgl. 2 mg G · SH m/380	G · SH	
		Phen-piasel. m/392	Phen-pias.	Phen-pias.
61	280	55	57	54

Die Beeinflussung der Glyoxalase durch Vitamin C.

In den lebenden Zellen sind eine Reihe von Redoxsystemen bekannt, die für die Aufrechterhaltung eines stark negativen Potentials verantwortlich sind. Nach *Wurmser*[39]) ist hier an erster Stelle das Vitamin C, die Ascorbinsäure, zu nennen.

39) *Wurmser* u. *Coreiro*, J. chim. phys. **31**, 419 (1934).

Dass Ascorbinsäure auch für die Geschwindigkeit der Milchsäurebildung aus Methyl-glyoxal von Wichtigkeit sein kann, beruht auf der Eigentümlichkeit der Ascorbinsäure, das Glutathion in Lösungen vor der Oxydation durch Sauerstoff zu schützen[40]. So erwiesen sich äquimolare Mengen der beiden Stoffe als vollständig resistent gegen Oxydation und nahmen im Laufe mehrerer Stunden keinen Sauerstoff auf (vgl. auch S. 37 im Versuchsteil). Vielleicht sind die in zwei Fällen eingetretenen Aktivierungen durch Ascorbinsäure — einmal bei Leberextrakt, einmal bei Trockenmuskel — mit dieser Tatsache in Zusammenhang zu bringen. Die Ascorbinsäure hätte demnach die Aufgabe, den Substrataktivator der Glyoxalase vor Oxydationen in der lebenden Zelle zu schützen[41].



Figur 1.
Ascorbinsäure als Aktivator der Glyoxalase.
I ohne Zusatz von Ascorbinsäure
II mit Ascorbinsäure ($4{,}5 \cdot 10^{-3}$ m)

40) *Bersin, Köster u. Jusatz*, H. S. 235, 12 (1935).
41) *Altenburger*, Klin. Wochenschr. 15, 1129 (1936).

Tabelle 4.

0,5 ccm Extrakt aus Schweineleber 0,5 ccm Pufferlösung 2 mg Methyl-glyoxal		
entwickelten in den ersten 5 Minuten an Kohlensäure		
ohne weitere Zusätze	mit 3,1 mg G·SH	mit 3,1 mg G·SH 1,7 mg Asc.
0	64	96 cmm

Ueber den Mechanismus der Glyoxalasewirkung, sowie über die Rolle des Flavinenzyms.

Die Reaktion, die von der Glyoxalase katalysiert wird, stellt eine innere Wasserstoffverschiebung dar. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das eigentliche Substrat des Fermentes das Halbmercaptal mit G·SH ist, lässt sich dies folgendermassen ausdrücken:

$$CH_3 \cdot CO \cdot CH(OH) \cdot SG + H_2O \rightarrow CH_3 \cdot CH(OH) \cdot COOH + G \cdot SH$$

Welche tatsächlichen Vorgänge dieser summarischen Formulierung zu Grunde liegen, war noch völlig unklar.

Grundsätzlich sind jedenfalls zwei Möglichkeiten gegeben:

A. Der Wasserstoff wird am Substrat umgelagert.

B. Der Wasserstoff wird vom Substrat abgelöst und auf ein anderes Molekül übertragen.

Der erste Fall (A):

$$\begin{array}{lcl} CH_3 & & CH_3 \\ \cdot & & \cdot \\ CO & & CH \cdot OH \\ \cdot & \xrightarrow{\text{enzymat.}} & \cdot \\ CH \cdot OH & & CO \\ \cdot & & \cdot \\ SG & & SG \end{array} \qquad \begin{array}{c} \\ \\ H_2O \\ \xrightarrow{\text{nichtenzymat.}} \\ \\ \\ \end{array} \qquad \begin{array}{l} CH_3 \\ \cdot \\ CH \cdot OH + G \cdot SH \\ \cdot \\ COOH \end{array}$$

stellt eine bei α-Keton-alkoholen unter dem Einfluss von OH' verlaufende, bekannte Umlagerung dar[45]).

Fassbare Zwischenprodukte treten nicht auf, da Ester aus Carbonsäuren und Thiolen ausserordentlich leicht hydrolytisch spaltbar sind.

45) *Denis*, C. 1908 I, 346.

Im zweiten Falle (B) kämen als Zwischenprodukte Milchsäurealdehyd oder Brenztraubensäure bezw. deren Halbmercaptale in Frage.

Ein Befund von *Jost*[46]) scheint in diese Richtung zu deuten.

Für den Fall, dass tatsächlich dieser Weg bei der Dismutation beschritten wird, hat man bezüglich des Mechanismus wieder zwei Möglichkeiten (I und II) zu unterscheiden.

Entweder (I): Der Wasserstoff wird durch das Ferment vom Methyl-glyoxal abgelöst und auf das entstandene Brenztraubensäure-Molekül übertragen. Für diese thermodynamisch unwahrscheinliche Reaktion liegen keine Anhaltspunkte vor.

Oder (II): Es liegen zwei Dehydrasesysteme vor, von denen das eine Brenztraubensäure-thiolester hydriert und zwar mit Hilfe des Wasserstoffs, den es vom Methyl-glyoxal-halbmercaptal dehydrierenden anderen System empfängt:

1. $CH_3 \cdot CO \cdot CH(OH) \cdot SG + Enz \rightleftharpoons CH_3 \cdot CO \cdot CO \cdot SG + Enz\langle^{H}_{H}$
2. $Enz\langle^{H}_{H} + F \rightleftharpoons Enz + F\langle^{H}_{H}$
3. $F\langle^{H}_{H} + Enz' \rightleftharpoons F + Enz'\langle^{H}_{H}$
4. $Enz'\langle^{H}_{H} + CH_3 \cdot CO \cdot CO \cdot SG \rightleftharpoons CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot SG + Enz'$
5. $CH_3 \cdot CH(OH) \cdot CO \cdot SG + H_2O \longrightarrow CH_3 CH(OH) \cdot COOH + G \cdot SH$

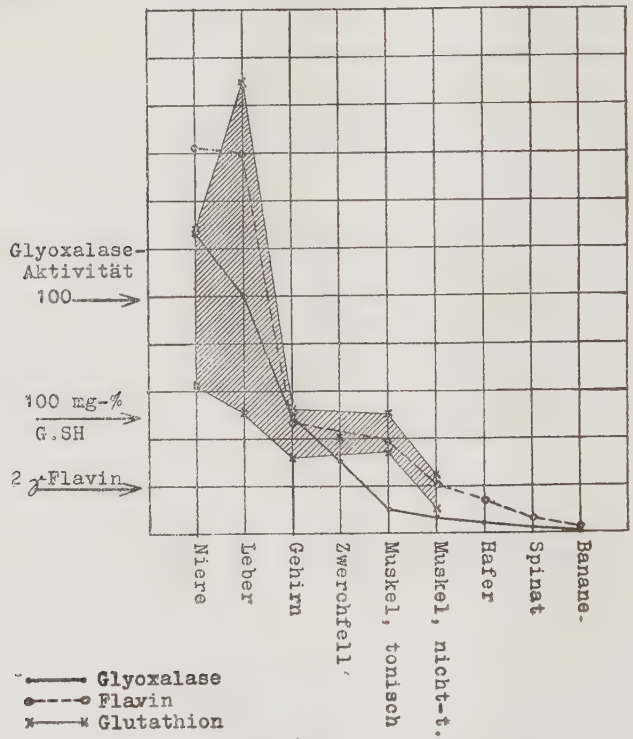
Der zweite Fall (B II) setzt nach *v. Euler*[47]) zwei unabhängige Dehydrasensysteme (Enz und Enz') und die Beteiligung von Flavinenzym (F) voraus, durch welches die beiden Dehydrasen miteinander verknüpft werden. Bezeichnenderweise findet man nun in fraktionierten Fällungen von Hefeautolysat[48]) den überwiegenden Teil der Glyoxalase-Aktivität in den Anteilen wieder, die allein eine Wirksamkeit als Milchsäure-Dehydrase (Enz') besitzen. Möglicherweise liegt im Enz das Triphospho-Pyridin-Nucleotid, gebunden an das spezifische Protein vor (*Warburg* u. *Christian*).

46) *Jost*, H. S. **230**, 106 (1934); vgl. a. *Lohmann*, Bio. Z. **254**, 334 (1932), Fussnote; *Barrenscheen* u. *Beneschowsky*, Bio. Z. **255**, 453 (1932).

47) *v. Euler* u. *Adler*, H. S. **238**, 251 (1936).

48) *Adler* u. *Michaelis*, H. S. **235**, 156 (1935).

Wichtiger ist jedoch, dass sich eine weitgehende Parallelität zwischen Flavinenzymgehalt und Glyoxalase-Aktivität des lebenden Materials feststellen liess. Somit wird die Glyoxalasewirkung nach dem Stand unserer heutigen Erkenntnisse am besten durch die obige Reaktionsfolge (B II) ausgedrückt.



Figur 2.

Der Vergleich von Flavingehalt und Glyoxalase-Aktivität der verschiedenen Materialien ergibt folgende Zusammenstellung in Tabelle 5. Als Werte der Glyoxalasewirksamkeit sind die in den unten beschriebenen Versuchen bestimmten Aktivitäten eingesetzt. Die Angaben über den Flavingehalt entstammen der Literatur. Zur besseren Uebersicht sind in einer zweiten Spalte die Flavin- und Glyoxalasewerte je auf den kleinsten vorkommenden Betrag (Banane = 1) reduziert worden.

Tabelle 5.

Art des Materials	Flavingehalt		Glyoxalase-Akt.	
	γ/kg		cmm/min. g	
Banane[49] [50]	75	1	1,79	1
Spinat[50]	570	7,6	6,2	3,4
Hafer[50]	1420	18,9	13,3	7,4
Leber (Ratte)[50] [51]	15600—16900	226	580	324
Dorsch, Leber[50]	530	7,1	99,4	55,5
Dorsch, Muskel[49]	Spur	—	14,6	8,2
Dorsch, Gehirn	?		122	68

Man erkennt, dass mit steigendem Flavingehalt auch die Glyoxalase-Aktivität zunimmt. Von einer Proportionalität der beiden Grössen kann jedoch keine Rede sein. Dies hängt zum Teil sicher mit der nicht sehr grossen Genauigkeit der Bestimmungsmethoden zusammen. Bei der Aktivitätsbestimmung muss man mit einem möglichen Fehler von 10% rechnen. Für die kolorimetrische Flavinbestimmung, nach welchem Verfahren die oben angegebenen Werte gewonnen worden sind, liegt nach *Kuhn*[50] bei mittleren Flavinmengen (1 mg) die Fehlergrenze bei etwa 20% und kann bei kleinen Mengen (0,1 mg) 50% überschreiten. Die ungünstigsten Verhältnisse vorausgesetzt, reichen doch diese Unsicherheit der Bestimmungsmethoden nicht aus, um die beträchtlichen Abweichungen von der Gradlinigkeit zu erklären, selbst wenn man noch berücksichtigt, dass nur ungefähr 80—90% des Flavins hochmolekular gebunden, als „gelbes Ferment" — auf welches allein es hier ankommt —, vorliegen. Die im Verhältnis zu kleinen Glyoxalase-Aktivitäten von Spinat und Hafer haben ihren Hauptgrund wahrscheinlich in einer Schädigung des Enzymsystems, hervorgerufen durch die unphysiologisch hohe Versuchstemperatur und die Verschiebung der normalerweise saueren Reaktion des Zellinhalts ins alkalische Gebiet. Hierauf deutet auch die Form der Umsatzkurven hin, welche frühzeitige Umbiegungen zur Abszissenachse hin aufweisen. Die Banane dagegen mit ihrem, als tropischem Gewächs,

49) *Stepp, Kühnau, Schröder,* Die Vitamine 1936, S. 51.
50) *Kuhn, Wagner-Jauregg u Kaltschmidt,* B. 67, 1454 (1935).
51) *Kuhn, Kaltschmidt u. Wagner-Jauregg,* H. S. 232, 36 (1935).

höheren Temperatur-Optimum erleidet keine Schädigung und zeigt einen streng geradlinigen Umsatz.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Geweben des Dorsches. Muskel und Leber besitzen eine höhere Wirksamkeit, als ihrem Flavingehalt entsprechen sollte. Die Glyoxalase-Aktivität ist nur ein Mass für die Flavinenzymmenge — auf deren Bestimmung laufen die vergleichenden Aktivitätsmessungen letzten Endes hinaus —, wenn die vom gelben Ferment (F) besorgte Wasserstoffübertragung (2 und 3) den langsamsten und darum geschwindigkeitsbestimmenden Vorgang der Gesamtreaktion darstellt. Im anderen Falle, wenn die Reaktionen 1 oder 4 langsamer sind, gibt die Glyoxalase-Aktivität ein Mass für die Geschwindigkeit dieser Reaktionen, beziehungsweise für die Menge der sie beherrschenden Katalysatoren (Enz oder Enz') ab. In diesem Sinne findet die hohe Glyoxalase-Aktivität der Dorschgewebe eine einleuchtende Erklärung in der Annahme, dass hier — neben der zu klein bestimmten Flavinmenge — ein dem Optimum mehr angenähertes Mengenverhältnis der Dehydrasen vorliegt. Das Letztere ist nur der Ausdruck dafür, dass Flavinenzym für die Wirksamkeit des Systems der Glyoxalase notwendig, aber noch nicht ausreichend ist. Dies zeigen auch Befunde am Hühnerei; weder Eiklar, noch Eigelb besitzen trotz ihres recht hohen Gehaltes an Flavinenzym auch nur die geringste Glyoxalase-Aktivität. Man muss annehmen, dass die übrigen Komponenten des Systems erst im Laufe der Entwicklung in der Zelle gebildet werden (siehe Tabelle 19).

Schliesslich wurden in einer weiteren Zusammenstellung (Tabelle 6) die in der Literatur erhältlichen Daten über Glyoxalase-Aktivität und Flavingehalt verschiedener Gewebe verglichen. Den eigenen Zahlen fügen sich die von *Platt* und *Schröder*[52]) an normalem Rattengewebe gefundenen Glyoxalasewerte befriedigend gut ein. Die Aktivität wurde von den amerikanischen Autoren in cmm CO_2/20 min und 1 mg getrocknetem Gewebe ausgedrückt. Die eigenen Werte (in cmm CO_2/1 min und 1 g frischer Substanz) wurden so umgerechnet, dass die Wirksamkeit

52) *Platt* u. *Schroeder*, J. biol. Chem. 106, 188 (1934).

der Rattenleber gleich 100 gesetzt wurde. Die so erhaltenen Zahlen sind eigentlich nicht ohne weiteres vergleichbar, da im einen Falle mit Gewebeschnitten und im anderen mit Gewebebrei gearbeitet worden ist. Dennoch wurde angenommen, dass es in erster Annäherung zulässig ist, die Aktivitäten so zu vergleichen, und dass auf diese Weise die Verhältnisse zumindest der Grössenordnung nach richtig wiedergegeben werden.

Platt und *Schroeder* haben nicht bei maximaler G·SH-Aktivierung gemessen und waren somit dem Einfluss der schwankenden Glutathiongehalte der Gewebe unterworfen. Offenbar hängt es hiermit zusammen, dass von ihnen die Niere aktiver gefunden wurde als die Leber, obwohl beiden Organen der gleiche Gehalt an Flavinenzym zukommen dürfte. Zur Uebersicht wurde deshalb der Tabelle je eine Spalte mit Glutathion- und Ascorbinsäure-Gehalten beigefügt.

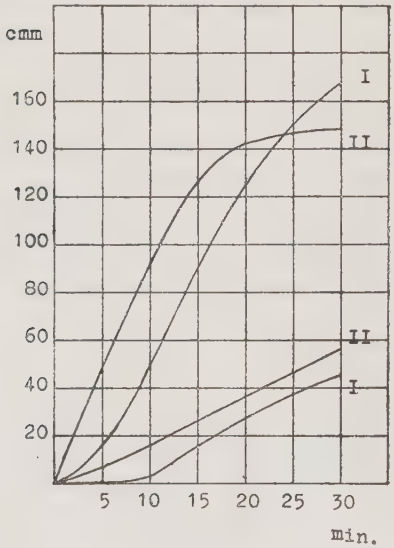
Tabelle 6.

Gewebsart	Glyoxalase[52]	Flavinenzym		Glutath.[53][54] mg-%	Ascorbinsäure mg-%
		γ-Flav.[50][55]	I. E. B_2[56]		
Niere	123	10—20	3—5	125—245	8—21
Leber	100	10—20	3—5	105—378	4—10
Milz	55	1		89	
Gehirn	49	1—5		63—95	15—26
Herz		10	2	60—80	
Jensen-Sark	25	0,5		74	
Musk. tonisch	6		1	70—100	1—3
Musk. nichttonisch			0,5	20—47	0,5—1,5
Gras (Hafer)	2	1,4			
Spinat	1	0,6			
Banane	0,3	0,07			

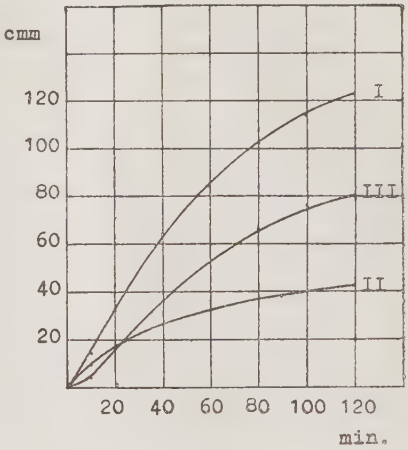
Der Versuch, flavinenzymarme Präparate aus Hefe durch Zusatz von gelbem Ferment zu aktivieren, blieb jedoch ohne Erfolg. Ebenso wenig gelang es, das Flavinenzym durch Strahlung (Sonne und Ultraviolett) zu zerstören und danach eine Aktivierung zu beobachten. Nach Zusatz von Flavinenzym war

53) *Wacholder, Anders* u. *Uhlenbruck*, H. S. **233**, 181 (1935).
54) *Wacholder* u. *Quensel*, Pflügers Arch. **235**, 70 (1934).
55) *v. Euler* u. *Adler*, H. S. **223**, 108 (1934).
56) *György, Kuhn, Wagner-Jauregg*, H. S. **223**, 21 (1934).

die Milchsäurebildung zwar grösser (Fig. 3), aber es stellte sich heraus, dass dies ein rein additiver Effekt des gelben Fermentes war*), das für sich allein schon eine geringe Glyoxalasewirkung besass (siehe Fig. 4).



Figur 3.
Einfluss des Flavin-Enzyms auf zwei verschieden aktive Glyoxalase-Präparate.
Enzymatische Milchsäurebildung ohne (I) und mit (II) Flavin-Enzym.



Figur 4.
Glyoxalase des gelben Ferments.
Milchsäurebildung:
I. mit gelbem Ferment.
II. ohne g. f. (nichtenzymatisch).
III. enzymatisch.

Die von *Sakuma*[57]) mit Glukose sowie glukosehaltigen Polysacchariden und von *Girsavicius*[58]) mit n-Propylalkohol erhaltenen Aktivitätssteigerung der Glyoxalase, sollten sich an diesem weitestgehend von anderen Fermenten befreiten Präparat (mit Ausnahme von Flavinenzym, das als Teilnehmer des Systems nicht mitzählt) besonders schön wiederholen lassen. Aber keine

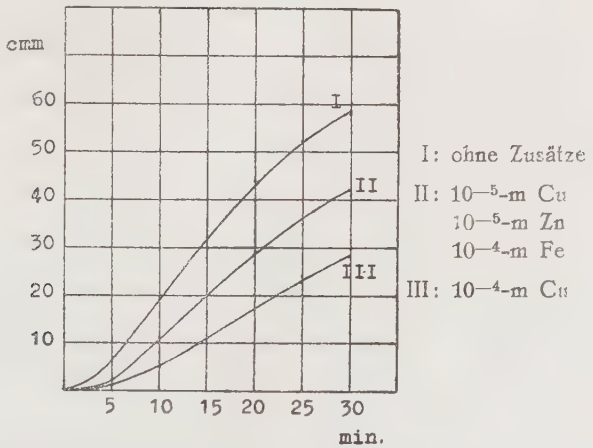
*) Ich verdanke Herrn Dr. *Th. Wagner-Jauregg* durch Vermittlung von Herrn Dr. *Th. Bersin* das nach der Chloroform-Methode gereinigte Präparat. Es enthält nach Mitteilung der Darsteller beigemengte Glyoxalase.

57) *Sakuma*, J. Biochem. **12**, 247 (1930).

58) *Girsavicius*, Bio. Z. **260**, 292 (1933); vgl. auch *Neuberg u. Kobel*, Bio. Z. **182**, 470 (1927).

von beiden Substanzen, weder Glukose noch Propanol, hatten einen Einfluss auf die Glyoxalasewirkung. Genau so wenig Erfolg hatte der Versuch, die Umwandlung des Methylglyoxals durch zugesetzte Redoxfarbstoffe zu beeinflussen, der im Hinblick auf Befunde von *Schott* und *Borsook*[59]) angestellt wurde.

Dagegen gelang es zu zeigen, dass Kupfer auch in 10^{-6}-molarer Lösung selbst bei tausendfachem Ueberschuss komplexbildender Substanzen noch eine rund 25%ige Hemmung ausübt, wodurch die von *Lohmann* geäusserte Ansicht, dass die Schwermetallhemmung am Ferment selber und nicht am Glutathion angreift, eine neue Stütze erhält.



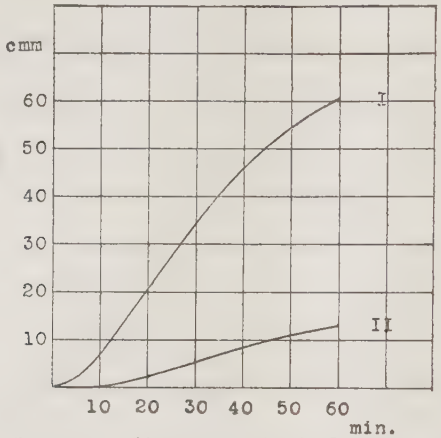
Figur 5. Hemmung durch Schwermetall.

Die Co-Zymase und ihre Beziehung zu den Wirkgruppen der Teilenzyme

Bei der Glyoxalase fand sich in keinem Fall eine Aktivierung mit Co-Zymase. Hieraus ist zu folgern, dass dieses System keine Dehydrase enthält, deren aktive Gruppe die Co-Zymase ist. Dieser Befund steht in Einklang mit Beobachtungen über den Einfluss der Co-Zymase auf den Glukose-Abbau (II. Abbaurichtung) und der Annahme, dass das Methyl-glyoxal hier als Zwischenprodukt auftritt.

59) *Schott* u. *Borsook*, Science **77**, 589 (1933); *Green*, *Strickland* und *Tarr*, Biochem. J. **28**, 1812 (1934).

Auffällig ist eine an der Glyoxalase des gelben Fermentes gefundene starke Hemmung. Ob es sich hierbei, wie im Falle des Schardinger-Enzyms[63]) um den Einfluss des Purinkerns der Co-Zymase handelt, muss vorläufig dahingestellt bleiben.



Figur 6. **Hemmung durch Co-Zymase.**

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind die Beobachtungen über die Darstellbarkeit gereinigter und haltbarer Glyoxalase-Trockenpräparate, sowie die Aufdeckung des Zusammenhanges zwischen dem Gehalt verschiedener Gewebe an Glyoxalase und Flavinenzym.

Damit ist erstmalig ein Einblick in den Reaktionsmechanismus der enzymatischen Umwandlung von Methyl-glyoxal zu Milchsäure möglich geworden. Ausserdem erhält die praktisch wichtige Beobachtung von *Stepp*[64]) über die Blutzuckersenkung beim Diabetiker durch Vitamin B_2 eine theoretische Grundlage. Die Bedeutung der zum ersten Mal beobachteten Hemmung der Glyoxalase durch Organoselenverbindungen und Co-Zymase, sowie der Aktivierung durch Ascorbinsäure kann erst nach präparativer Klärung der Zusammensetzung des Enzymsystems der Glyoxalase ermessen werden.

63) *Andersson*, H. S. **235**, 217 (1935); *Dixon* u. *Thurlow*, Biochem. J. **18**. 976 (1924).

64) *Stepp, Kühnau* u. *Schröder*, Die Vitamine 1936, S. 54.

Versuchsteil.

1) Messmethode.

Die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit erfolgte nach Warburgs manometrischer Methode[65]), deren Brauchbarkeit für die Untersuchung der Glyoxalase von *Lohmann*[13]), sowie *Platt* und *Schroeder*[66]) dargelegt worden ist. Ein Teil der Versuche wurde so ausgeführt, dass Ferment, Pufferlösung, Glutathion und alle übrigen Zusätze in das Hauptgefäss kamen, das Methylglyoxal in den Anhang. Nach dem Verdrängen der Luft durch ein Kohlensäure-Stickstoff-Gemisch wurde 10 Minuten lang unter Schütteln temperiert und dann bei offenen Hähnen eingekippt. Nullzeit ist zwei Minuten später, gleich Schliessen der Hähne. Bei einem anderen Teil der Versuche gelangte die Enzymlösung statt des Methylglyoxals in den Anhangsraum. In diesen Fällen wurde meist ohne Oeffnungszeit gearbeitet, sodass hier Nullzeit und Augenblick des Einkippens zusammenfallen.

Wenn man nämlich Aufschluss über den Reaktionsablauf in den ersten Augenblicken nach dem Zusammenbringen von Substrat und Ferment haben will, ist das Verfahren des mehrere Minuten langen Offenhaltens der Hähne ungeeignet. In Uebereinstimmung mit *Girsavicius*[67]) hatten *Platt* und *Schroeder* die Oeffnungsperiode empfohlen, um den Fehler der „Glyoxaffin-Reaktion" auszuschalten. Es zeigte sich aber, dass die Kohlensäureentbindung, auf einer Reaktion zwischen Methyl-glyoxal und Eiweißstoffen oder Aminosäuren beruhend, nur unbedeutend sein kann. Man beobachtet nämlich beim Einkippen des Fermentes mit geschlossenen Hähnen dieselbe Kohlensäureentwicklung, ob nun Methylglyoxal im Ansatz anwesend ist oder nicht. Genau so verhält es sich, wenn das Methylglyoxal eingekippt wird; man bekommt den gleichen Druckanstieg ohne, wie mit

65) *Rona*, Praktikum d. physiol. Chem. 1931, S. 132 u. 238.
66) *Platt* u. *Schroeder*, J. biol. Chem. **104**, 281 (1934).
67) *Girsavicius*, Bio. Z. **260**, 278 (1933).

Ferment, vorausgesetzt, dass kein Glutathion zugegen ist. Die Extra-Kohlensäureentwicklung ist wohl durchweg eine Folge der sauren Reaktion der Enzymlösungen. Offensichtlich ist dies der Fall auch beim Methylglyoxal, das schon gegen Lackmus deutlich sauer reagiert und im allgemeinen auch grössere Ausschläge beim Einkippen liefert. Rohe Fermentlösungen ergeben stärkere Kohlensäureentwicklung als durch Umfällen gereinigte. Letztere sind selbstverständlich auch eiweisshaltig. Wenn aber doch eine Glyoxaffin-Reaktion vorkommen sollte, ist sie schwerlich nach 2—3 Minuten zu Ende gekommen. Es ist deshalb richtiger, das Ausmass der Extra-Kohlensäureentbindung in einem Kontrollansatz zu bestimmen und von dem Gesamtwert des Hauptversuchs abzuziehen. Dieses letztere Verfahren wurde bei der Mehrzahl der Versuche angewandt.

Das Gasgemisch wurde in einem 10 l fassenden Glasbehälter hergestellt. Als Sperrflüssigkeit diente gesättigte, ausgekochte Natriumchloridlösung, die gegen Zutritt von Luft und gegen Wasserverlust durch eine etwa 2 cm dicke Paraffinölschicht geschützt war. Die Kohlensäure wurde direkt der Bombe entnommen und lediglich durch eine Waschflasche mit Wasser geleitet. Der Stickstoff — gleichfalls aus einer Bombe — wurde zweimal mit Pyrogallol und einmal mit Wasser gewaschen. Eine schärfere Entfernung letzter Sauerstoffspuren, etwa durch Leiten über glühendes Kupfer, ist zwecklos, da ja beim Durchspülen der Gefässe nicht alle Luft wirklich entfernt werden kann. Anfangs wurde ein Gemisch mit 5% Kohlensäure verwandt. Da nach *Lohmann*[13]) ein höherer Kohlensäuregehalt die Umwandlungsgeschwindigkeit günstig beeinflusst (offenbar durch eine Verschiebung des pH), wurde bei den vergleichenden Aktivitätsbestimmungen ein Gasgemisch mit 17% Kohlensäure benutzt. Die aktuellen Wasserstoffionen-Konzentrationen wurden potentiometrisch mit der Glaselektrode bestimmt. Sie lagen für reinen Stickstoff bei pH 8,28, für ein Gemisch mit 5% CO_2 bei pH 8,21, und für 17% CO_2 bei pH 7,30.

Die Messungen wurden zuerst bei einer Temperatur von 36° C ausgeführt. Da sich aber bei dieser Temperatur öfters

sehr bald eine Abnahme der Aktivität feststellen liess, wurde später bei 30° gemessen, wo fast immer geradlinige Umsatzkurven erhalten wurden. Die Aktivitätsverminderung ist wahrscheinlich die Folge einer Schädigung des Enzyms selber. Möglicherweise spielt aber auch der hydrolytische Zerfall des Glutathions eine Rolle, das bei 37° langsam in Pyrrolidoncarbonsäure und Cysteinylglykokoll gespalten wird.

Das Methylglyoxal wurde in höchstens m/100-Lösung angewandt, da grössere Konzentrationen auf das Enzym schädigend wirken sollen[68]). Zur Verwendung gelangten zwei verschiedene Präparate, von denen das eine aus Dioxyaceton, das andere aus Aceton dargestellt wurde. Das zweite verdient wegen seiner grösseren Reinheit den Vorzug.

Als Fermente dienten fast ausschliesslich Enzymlösungen, zum Teil aber auch Organsuspensionen. Ihre Menge wurde durch Verdünnen und Abpipettieren entsprechender Volumina dosiert. Nur im Falle des Trockenmuskels wurde das Organpulver als solches verwendet. Es wurden die für einen Ansatz bestimmten Mengen, die verhältnismässig gross sein mussten (20 mg), in das Anhangsgefäss eingewogen. Eine Korrektion des Gasvolumens wurde hierfür nicht angebracht. Denn das Volumen der einpipettierten Flüssigkeiten wird durch das darin aufquellende Muskelpulver nur unbedeutend vergrössert. Es ist jedenfalls kleiner als die Summe der Volumina von Flüssigkeit und trockenem Fermentpulver. Ausserdem enthalten die Gefässkonstanten, die sich voneinander nur wenig unterscheiden, alle denselben Fehler von rund 0,1%, wodurch die Messgenauigkeit der ganzen Anordnung, die mit einem mittleren Fehler von etwa 2% behaftet ist, nicht weiter beeinträchtigt wird.

Die Reaktionsgefässe hatten einen Inhalt von ungefähr 15 ccm und besassen ein Anhangsgefäss mit einem Fassungsvermögen von $^1/_2$ ccm. Sie wurden nach jedem Versuch mit warmer Chromschwefelsäure gründlich gereinigt, zwanzigmal mit Leitungswasser und zehnmal mit destilliertem Wasser gespült, ausgedämpft und getrocknet. Eine Messung nimmt dann folgenden

68) *Kisch*, Bio. Z. **253**, 373 (1932).

Gang: Nachdem alle Reaktionsteilnehmer eingefüllt sind, werden die Gefässe am Manometer befestigt und in den Thermostaten eingesetzt. Nun werden sie 10 Minuten lang mit dem Gasgemisch durchspült und dann ebenso lang bei geschlossenen Hähnen unter Schütteln temperiert. Wenn sich das Gasvolumen nicht mehr ändert (Anzeichen für beendeten Temperaturausgleich), wird bei stillstehender Schütteleinrichtung und geöffneten Gefässen der Nullpunkt eingestellt und einige Minuten später, das heisst rund 25—30 Minuten nach der Füllung, der Inhalt des Anhangs in den Hauptraum eingekippt und das Ganze durch mehrfaches Hin- und Herspülen gut durchgemischt. Bei der nun einsetzenden Reaktion entsteht Milchsäure und setzt aus dem Bicarbonatpuffer eine aequivalente Menge Kohlendioxyd in Freiheit. Durch das Schütteln wird für schnelle Einstellung des Gleichgewichtes zwischen gelöster und gasförmiger Kohlensäure gesorgt. Alle 5 oder 10 Minuten vom Einkippen an gerechnet, wird das Schütteln unterbrochen und die Höhe des linken Meniskus abgelesen.

2) Berechnung der Ergebnisse.

Die Messung selber liefert nur Druckänderungen. Da abe im geschlossenen System gearbeitet wird, sind Druckzunahmen den entwickelten, Druckabnahmen den verbrauchten Gasvolumina direkt proportional. Der Druck wird in mm Brodie ausgedrückt; 10000 mm entsprechen 760 mm Quecksilber. Man erhält aus der Drucksteigerung in mm durch Multiplikation mit der „Gefässkonstanten" die in Freiheit gesetzte Kohlensäuremenge in cmm. Diese Konstante berechnet man aus dem Gesamtvolumen des Reaktionsraumes nach der Formel:

$$K = \frac{V_f \cdot \alpha - V_g \cdot 273/T}{10000}.$$

Hierin bedeuten V_g das Volumen des Gasraumes, V_f das Volumen der Flüssigkeit, α den Absorptionskoeffizienten des Kohlendioxyds für die Versuchstemperatur und T die Versuchstemperatur. Einem Kubikmillimeter entwickelter Kohlensäure entsprechen

0,0045 mg Milchsäure. Diese letzte Umrechnung bietet keine Vorteile und wurde deshalb auch nie durchgeführt.

Die CO_2-Retention fand keine Berücksichtigung. Denn einmal ist sie in allen Versuchsreihen, die untereinander zu vergleichen sind, gleich gross. Dann ist sie in ihrem Ausmass nicht mehr bedeutend, jedenfalls kleiner als die von der sauer reagierenden Methylglyoxal-Lösung entwickelte Gasmenge. Diese wird aber in Kontrollansätzen ermittelt und in Abzug gebracht.

Die im Hauptversuch gefundene Kohlensäureentwicklung gibt nämlich noch nicht ohne weiteres eine Grundlage für die Berechnung der Aktivität ab. Die Fermentpräparate enthalten öfters von sich aus schon Substrate, die während der Versuchsdauer zu sauer reagierenden Produkten umgewandelt werden und aus dem Puffer Kohlensäure frei machen. Andererseits wird das Methylglyoxal in der alkalischen Flüssigkeit auch auf nicht-enzymatischem Wege allmählich in Milchsäure verwandelt. Diese beiden Beträge müssen also erst von der Gesamtkohlensäuremenge abgezogen werden, ehe man die Gasentwicklung erhält, die von der durch die Glyoxalase gebildeten Milchsäure herrührt, und die allein ein Mass der Enzymwirksamkeit darstellt.

Wenn man die Glyoxalase-Aktivität verschiedenen natürlichen Materials untereinander vergleichen will, genügt es nicht, wie es mehrere Autoren gemacht haben, als Mass der Wirksamkeit die Anzahl Kubikmillimeter Kohlensäure, welche in einer festgelegten Zeitspanne entwickelt werden, oder den reziproken Wert zur Zeit zu wählen, die für einen bestimmten Umsatz erforderlich ist. Es muss vielmehr auch noch die zur Verwendung gekommene Substanzmenge berücksichtigt werden. Am einfachsten drückt man dann die Aktivität als die in der Zeiteinheit von einem Gramm Enzympräparat aus m/100-Methylglyoxal-Lösung bei maximaler Glutathion-Aktivierung entwickelte Kohlensäuremenge (in cmm) aus:

$$Q = \frac{\text{cmm } CO_2}{\text{sec} \cdot \text{g Substanz}}$$

Da diese Art der Berechnung handliche Zahlen liefert und bequem auszuführen ist, wurde sie in allen anderen Fällen, wo

Fermentwirksamkeiten verglichen werden sollten, angewandt. Bei Organbrei und Gewebesuspensionen liegt der Fall sehr einfach; hier ist die Enzymmenge, auf welche die Aktivität zu beziehen ist, gleich der angewandten Substanzmenge. Bei Lösungen und Extrakten hätte man eigentlich nur das Gelöste in Rechnung zu stellen. Da seine Menge aber unbekannt ist und sich nur ungenau ermitteln lässt, wurde immer auf die gesamte (auch die ungelöste) Substanzmenge bezogen. Man erhält so natürlich zu kleine Werte für die Aktivität.

Die in der Zeiteinheit gebildete CO_2-Menge wurde stets für ein möglichst grosses Zeitintervall ermittelt. Zu diesem Zweck wurden die Umsatzdiagramme gezeichnet, die fermentativ gebildete Milchsäuremenge (ausgedrückt in cmm CO_2) als Abhängige der Reaktionszeit. Aus den Kurven ist leichter zu erkennen, wie lange die Reaktion nach einer scheinbaren nullten Ordnung verläuft, als aus dem Vergleich des CO_2-Zuwachses in gleichen Zeitabständen. Die Reaktion setzt nicht sofort mit voller Geschwindigkeit ein, sondern kommt erst allmählich in Gang, um nach 10 bis 20 Minuten ihre volle Stärke zu erreichen. Dann verläuft sie mit konstanter Geschwindigkeit weiter, bis der grösste Teil des Methylglyoxals verbraucht ist. Jetzt tritt eine Verminderung der Geschwindigkeit ein, weil die Konzentration des als Substrat dienenden Halbmercaptals, das sich bis zu einem Gleichgewicht aus Methylglyoxal und Glutathion bildet, abnimmt. Dies macht sich umso eher bemerkbar, je ähnlicher die molaren Konzentrationen der Bildungskomponenten des Halbmercaptals sind. Bei ganz kleinen G·SH-Konzentrationen (im Verhältnis zum Methylglyoxal) verläuft die Reaktion praktisch bis zum Ende mit konstanter Geschwindigkeit. *Platt* und *Schroeder*[66]) fanden dementsprechend, dass die in 20 Minuten entwickelte CO_2-Menge bei kleiner G·SH-Konzentration (0,25 mg) unabhängig von der Methylglyoxal-Menge war (in den Ansätzen schwankte die Konzentration zwischen 1 und 5 mg/2 ccm). In den Ansätzen mit viel Glutathion (2 mg) erhielten sie beim Uebergang zu den grösseren Methylglyoxal-Konzentrationen dann die doppelte Kohlensäure-Entwicklung. Es liegt aber denn-

noch keine Reaktion nullter Ordnung vor, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration unabhängig ist. Vielmehr ändert sich die Konzentration des eigentlichen Substrats, des Halbmercaptals, während eines langen Zeitraumes fast gar nicht. Sobald sie aber merklich abzusinken beginnt, wird auch die Reaktionsgeschwindigkeit kleiner; nach welcher Ordnung, das ist noch zu untersuchen.

Die Zeit-Umsatz-Kurven haben deshalb eine schwach ausgeprägte S-förmige Gestalt. Stärkere Biegungen des oberen Endes zur Abscissen-Achse hin deuten auf eine Schädigung des Enzyms oder auf eine allmähliche Zerstörung des Glutathions hin.

3) Fermentpräparate.

Muskelpulver,

Ein normales Meerschweinchen (oder Kaninchen) wurde durch Verblutenlassen aus der Carotis getötet. Nach dem Enthäuten wurden die grossen Muskeln der Extremitäten, des Rückens und der Brust abpräpariert und von Bindegewebe, Nerven, Drüsen und grossen Blutgefässen befreit. Sie wurden in einer Hackmaschine zerkleinert und mit dem doppelten Gewicht Aceton versetzt. Nach vier Stunden wurde das Aceton durch ein Filter dekantiert und der Muskelrückstand durch dreimalige Behandlung mit denselben Mengen absoluten Acetons gründlich entwässert. Darnach wurde das Aceton abgesaugt, der Rückstand auf dem Filter mit 100 ccm absolutem Aether nachgewaschen und eine halbe Stunde ausgebreitet an der Luft liegen gelassen. Nachdem der Rest des Aethers durch dreistündiges Trocknen im Brutschrank vertrieben war, wurde die krümelige Muskelmasse in einer Kugelmühle staubfein zermahlen.

Muskelextrakt.

Ein Gramm Muskeltrockenpräparat (Meerschweinchen) wurde bei 36° im Thermostaten mit 25 ccm Wasser zwei Stunden lang geschüttelt. Das Ungelöste wurde abzentrifugiert. 20 ccm der gewonnenen blanken Flüssigkeit wurden in 300 ccm Aceton eingetropft, wobei ein feiner weisser Niederschlag ausfiel. Nach

48stündigem Stehenlassen im Eisschrank wurde das nun Ausgeflockte abzentrifugiert. Es waren nach 6stündigem Trocknen im Brutschrank 40 mg eines gelblichen Pulvers, das sich in Wasser ohne Rückstand klar löste.

Extrakte aus Leber und Niere[13].

Frische Schweineleber wurde durch die Hackmaschine getrieben. 220 g Leberbrei wurden drei Stunden lang mit 600 ccm Wasser geschüttelt. Es wurde möglichst schnell filtriert (viele Filter) und dann scharf zentrifugiert (20 Min. bei 4000 Touren). Die erhaltene trübe Flüssigkeit (400 ccm) wurde mit 40 ccm molarem Acetatpuffer vom pH 4,5 versetzt. Eine halbe Stunde später wurde der gefallene Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat war vollkommen blank und schwach rot gefärbt. 300 ccm dieses Filtrats wurden in 4 l Aceton (eisgekühlt) eingetropft. Nach 20 Minuten wurde abgenutscht. Der Niederschlag wurde dreimal mit abs. Aether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Bei Niere (ebenfalls vom Schwein) wurde entsprechend verfahren. Es wurden jedoch keine Dauerpräparate aus den Extrakten hergestellt.

Fermentpräparate aus Hefe.

Ein Eimer Brauereihefe (Bopp), 10 kg, wurde zwei Tage lang mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser ungefärbt und nur noch wenig getrübt ablief. Nach dem Dekantieren wurde durch eine grosse Nutsche filtriert und die Hefe in einer Presse so weit von anhaftendem Wasser befreit, dass sie sich leicht mit der Hand zerkrümeln liess. 3 kg Presshefe wurden mit 220 ccm Essigester verrieben, bis sie ganz verflüssigt waren. Nun wurde alles mit 2,5 l Wasser in eine Fünfliterflasche hinübergespült, mit Ammoniak neutralisiert und 12 Stunden lang geschüttelt. Alle 30 Minuten wurde mit 5%igem Ammoniak neutralisiert. Nach beendigter Autolyse wurde durch sechs Faltenfilter nebeneinander möglichst schnell filtriert. Das Filtrat von 2,8 l wurde mit 2100 ccm Alkohol (96%) gefällt. Nach einstündigem Stehenlassen wurde der Niederschlag abzentrifugiert, mit abs. Alkohol verrieben, abgenutscht und je dreimal mit

abs. Alkohol und Aether gewaschen, schliesslich im Vakuum getrocknet: „Alkohol-Dehydrase".

Die beim Zentrifugieren angefallene Flüssigkeit von 4 l wurde nochmals mit 3 l 96%igem Alkohol versetzt. Der Niederschlag wurde am anderen Morgen abgesaugt, dreimal mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und im Vakuumexsikator über Chlorcalcium aufbewahrt: „Milchsäure-Dehydrase".

4) Darstellung von Methylglyoxal.

Aus Dioxyaceton.

Es wurden nach den Angaben von *Fischer* und *Taube*[69]) 50 g Dioxyaceton und 150 g Phosphorpentoxyd gut miteinander gemischt und im Wasserstrahlvakuum destilliert.

In der auf —20° gekühlten Vorlage kondensierten sich 9 g dunkelgelb gefärbtes Methylglyoxal von sehr zähflüssiger Beschaffenheit. Es wurde in dieser Form zu den Versuchen verwendet.

Aus Aceton.

Es wurde nach dem Verfahren von *Hahn* und *Schales*[70]) vorgegangen. 1100 ccm Aceton und 212 g Selendioxyd lieferten nach viermaligem Fraktionieren im Vakuum von 13—14 mm (Kolonne) 14 g Methylglyoxal, dessen Siedepunkt sich nicht mehr veränderte.

Das zunächst dünnflüssige Kondensat erstarrte nach einiger Zeit zu einer hell-grüngelben, glasigen Masse.

Die jodometrische Bestimmung[71]) ergab, dass das glasige Produkt zu 87,95% aus Methylglyoxal ($CH_3 \cdot CO \cdot CHO$) bestand, in Uebereinstimmung hiermit war die gravimetrische Bestimmung als Bis-Dinitrophenyl-hydrazon[72]).

5) Darstellung der Selenverbindungen.

Phenyl-piaselenol.

25 g o-Nitro-chlorbenzol und 35 g Anilin wurden durch 14-stündiges Erhitzen (215°) mit 13 g wasserfreiem Natrium-

69) *Fischer* u. *Taube*, B. **57**, 1502 (1924).
70) *Hahn* u. *Schales*, B. **67**, 1821 (1934).
71) *Fischler* u. *Böttner*, Z. f. analyt. Chem. **74**, 28 (1928).
72) *Simon* u. *Neuberg*, Bio. Z. **232**, 479 (1931).

acetat miteinander kondensiert. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Alkohol wurden 10 g 2-Nitro-diphenylamin vom Schmelzpunkt 75—76° erhalten.

10 g 2-Nitro-diphenylamin, gelöst in 120 ccm Alkohol (96%), wurde mit einem Gemisch aus 40 g Stanno-chlorid und 100 ccm konzentrierter Salzsäure reduziert. Nach der Reinigung über das Zinn-Doppelsalz erhielt man 6 g 2-Amino-diphenylamin (Smp. 80°)[73].

Aus dem Amino-diphenylamin erhält man nach *Battegay* und *Véchot*[74]) das Phenyl-piazselenazonium-chlorid, indem man äquimolare Mengen von Aminodiphenylamin (bei Gegenwart eines kleinen Ueberschusses Salzsäure) und selenige Säure, beide in Wasser gelöst, zusammenbringt. Nach kurzem Erwärmen begannen sich die tiefdunkelblauen Kristalle der Selenverbindung abzuscheiden. 1 g o-Amino-Diphenylamin ergab 1,4 g Phenyl-piazselenazonium-chlorid.

Chlorhydrat der Phenyl-piaselenol-2′-carbonsäure.

Nach *Ullmann*[75]) wurden 20 g Anthranilsäure, 16 g o-Chlornitrobenzol, 20 g kalzinierte Pottasche, 20 ccm Amylalkohol und 0,2 g Naturkupfer C drei Stunden auf 160—170° erhitzt. Nach dem Abblasen mit Wasserdampf wurde die rote Flüssigkeit mit Wasser aufs 10fache verdünnt und mit Salzsäure angesäuert. Der Niederschlag wurde ausgeäthert, in 2-n-Soda gelöst und wieder ausgefällt. Die orangeroten Krisialle der 2-Nitro-diphenylamin-2′-carbonsäure hatten den Schmelzpunkt 218 bis 219°; Ausbeute 6 g.

6 g der Carbonsäure in 120 ccm 96%iger-Alkokol wurde mit 25 g Stanno-chlorid in 70 ccm konzentrierter Salzsäure reduziert. Nachdem bis zur Aufhellung auf dem Wasserbad erwärmt war und der Alkohol abdestilliert war, wurde die restliche Lösung mit dem doppelten Volumen Wasser verdünnt. Nach dem Erkalten fiel das Zinndoppelsalz, das nach der Um-

73) *Kehrmann u. Havas*, B. **46**, 341 (1913).
74) *Battegay u. Véchot*, Bull. **37**, 1282 (1925).
75) *Ullmann*, A. **355**, 327 (1907).

kristallisation aus Wasser in alkoholischer Lösung (Erwärmen) mit konzentriertem Ammoniak zerlegt wurde.

Nach dem Filtrieren wurde die Lösung auf ein Zehntel eingeengt und in der Wärme vorsichtig mit Wasser versetzt. Nachdem alles erkaltet war, wurde der kristalline Niederschlag abgesaugt und getrocknet: 3,7 g schwach gelblich gefärbter Kriställchen von 2-Amino-diphenylamin, -2′-carbonsäure; F. 198° (unter Zersetzung).

Hieraus wurde in der gleichen Weise wie bei I die Selenverbindung hergestellt.

1 g 2-Amino-diphenyl-2′-carbonsäure lieferte 1 g Chlorhydrat der Phenyl-piazselenol-carbonsäure.

Das Chlorhydrat der Phenyl-piaselenol-4′-carbonsäure

wurde in entsprechender Weise aus p-Amino-benzoesäure und o-Chlor-nitrobenzol über 2-Nitro-diphenylamin-4′-carbonsäure und 2-Amino-diphenylamin-4′-carbonsäure dargestellt.

6) Hemmung der Glyoxalase durch Phenylpiaselenol.

Tabelle 7.

Zeit	0,5 ccm Pufferlösung (0,2-m $NaHCO_3$) Gesamt-Volumen 2,2 ccm 36°				
	20 mg Muskelpulver				
	3 mg G·SH — —	2 mg Methgl 3 mg G·SH —	3 mg G·SH 2 mg Methgl 3,3 m Php	3 mg G·SH — 3,3 mg Php	— — 3,3 mg Php
	I	II	III	IV	V
5′	39	72	38	44	43
10′	49	121	50	52	50
15′	54	171	54	56	53
25′	60	239	56	56	53
35′	62	280	55	57	53 ccm CO_2

Als Fermentpräparat diente zu diesem Versuch Meerschweinchen-Trockenmuskel. In den Hauptraum gelangten Pufferlösung, Methylglyoxal, Glutathion, Phenylpiaselenol (Php),

während das Fermentpulver sich im Anhang befand. Die Versuchstemperatur war 36°. Nach dem Einkippen folgte eine Oeffnungsperiode von zwei Minuten.

Um die Kohlensäuremenge zu erhalten, die der enzymatischen Milchsäurebildung entspricht, hat man die Differenzen der Spalten II—I und III—IV zu bilden:

Tabelle 8.

Zeit:	5′	10′	15′	25′	35′	
ohne Phen.-piasel.	33	72	117	179	218	
mit „ „	—6	—2	—2	0	—2	ccm CO_2

Man erkennt ohne weiteres die absolute Hemmung jeder Milchsäurebildung. Die in allen Ansätzen mit Phenylpiazselenol gleichermassen zu beobachtende CO_2-Entwicklung (Spalten III, IV und V) ist wahrscheinlich auf eine Spaltung der Selen-Verbindung zurückzuführen. Denn in alkalischer Lösung findet ein allmählicher rückläufiger Zerfall in Amino-diphenylamin und selenige Säure statt[+]).

7) Autoxydations-Versuche.

Tabelle 9.

5 ccm 36° rein. O_2	10 mg Ascorbinsäure Phosphatpuffer	10 mg Ascorbinsäure 1 mg Glutathion Phosphatpuffer		
Zeit	pH: 6,47	pH: 6,47	pH: 6,98	pH: 7,38
10′	84	6	11	19
20′	167	11	19	36
30′	252	16	27	54
40′	—	22	34	70
50′	392	27	42	87
60′	449	32	50	104
70′	496	36	58	121
80′	552	—	—	—
90′	580	—	—	—
100′	606	50	79	165
110′	624	55	87	181
120′	637	60	94	197
130′	—	64	102	214
180′	665	—	—	— ccm O_2

[+]) *Battegay* u. *Véchot*, Bull. **37**, 1275 (1925).

In die obige Tabelle 9 sind als Vergleichswerte bei reiner Ascorbinsäure nur die Zahlen der Sauerstoffzehrung bei pH 6,47 angeführt worden. Hier kommt die Oxydation, nachdem 93% der berechneten Menge Sauerstoff verbraucht sind, allmählich zum Stillstand. Bei den anderen beiden Wasserstoffionenkonzentrationen geht der O_2-Verbrauch jedoch weit über die für die Oxydation zur Dehydro-Ascorbinsäure nötige Menge hinaus. Vergleichsweise wurde in Diagrammen (Figur 7, 8 und 9) der O_2-Verbrauch der Ascorbinsäure-Lösungen mit 10% G·SH-Zusatz neben den Autoxydationskurven reiner Ascorbinsäure-Lösungen aufgetragen.

Ebenso wie Ascorbinsäure durch zugesetztes Glutathion weitgehend vor der Oxydation durch Sauerstoff geschützt werden kann*) — durch Zusatz einer äquimolaren G·SH-Menge wurde die Aufnahme von Sauerstoff überhaupt unterbunden, während ein 10%iger Glutathion-Zusatz die Absorption stark verzögerte (Tabelle 9) — gelang es auch, die Autoxydationsgeschwindigkeit des Glutathions durch Zusatz von 10% Ascorbinsäure beträchtlich herabzusetzen. Die Technik der Messung war dieselbe wie in den vorigen Versuchen. (Vergleiche auch Fig. 10, 11, 12).

Tabelle 10.

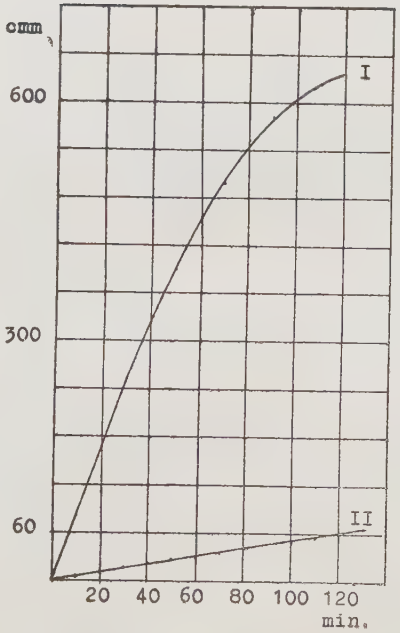
5 ccm 36° rein. O_2	10 mg Glutathion 1 mg Ascorbinsäure Phosphatpuffer		
Zeit	pH: 6,47	pH: 6,98	pH: 7,38
10′	13	44	66
20′	34	85	121
30′	55	120	161
40′	70	142	179
50′	82	160	191
60′	96	173	200
70′	108	184	207
80′	118	191	211
90′	126	196	214
100′	133	199	218
110′	141	—	220
120′	—	—	— ccm O_2

*) Siehe *Bersin, Köster u. Jusatz*, H. S. **235**, 17 (1935).

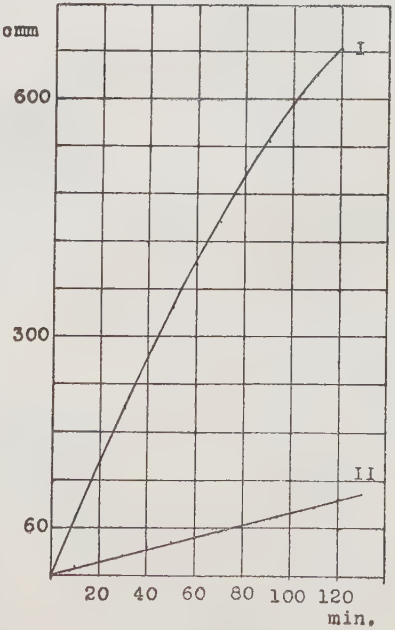
Autoxydation der Ascorbinsäure.

I: 10 mg Ascorbinsäure

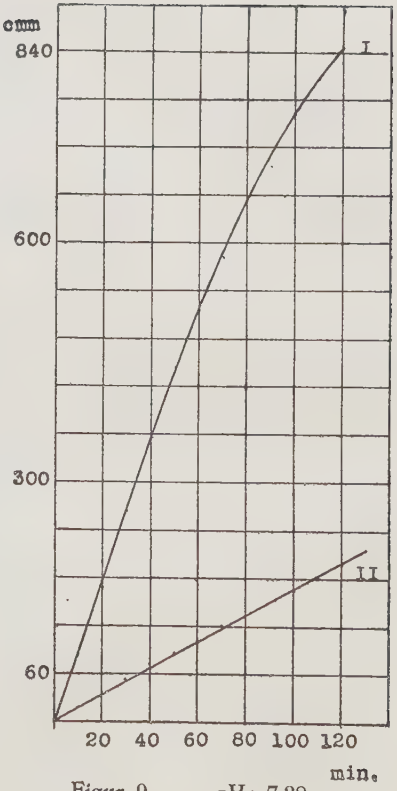
II: 10 mg Asc. + 1 mg G·SH



Figur 7 pH: 6,47



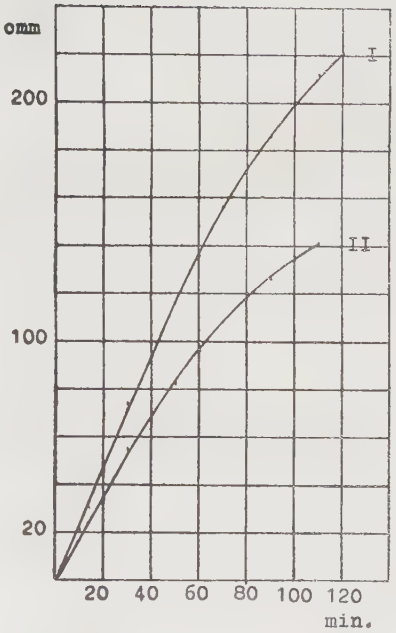
Figur 8 pH: 6,98



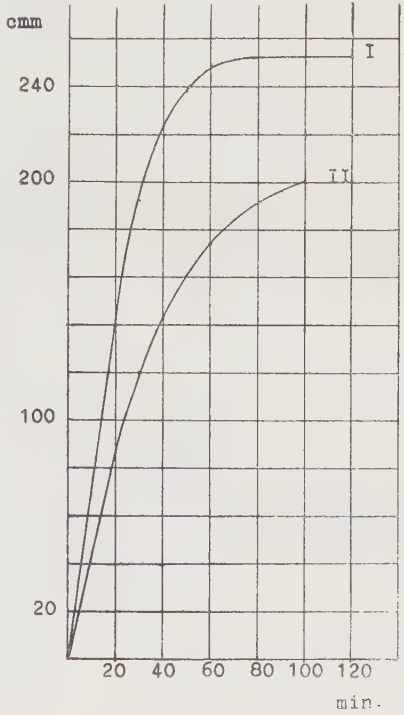
Figur 9 pH: 7,38

Autoxydation von Glutathion.

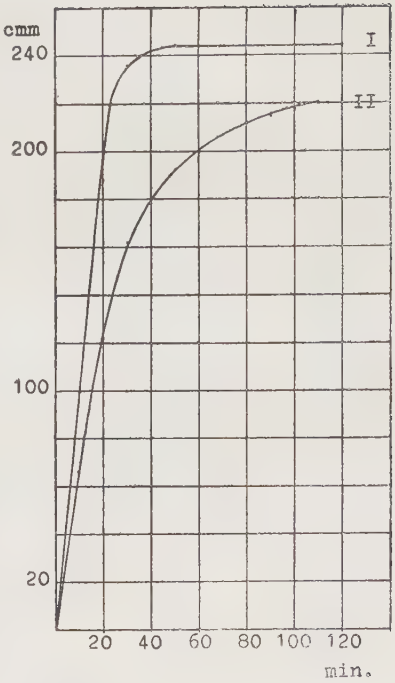
I: 10 mg Glutathion II: 10 mg G·SH + 1 mg Ascorbinsäure



Figur 10 pH: 6,48



Figur 11 pH: 6,98



Figur 12 pH: 7,38

8) Ascorbinsäure und Glyoxalase.

Tabelle 11.

Gesamt-Volumen 2,2 ccm
Temperatur: 36°
Oeffnungszeit: 2 Minuten
Ferment: Meerschweinchen-Trockenmuskel
Puffer: 0,2-m $NaHCO_3$ (0,5 ccm für jeden Ansatz)

	20 mg Muskp. 2 mg Methgl. 3 mg G·SH	20 mg Muskp. — 3 mg G·SH	20 mg Muskp. — —	— 2 mg Methgl. 3 mg G·SH
Zeit	I	II	III	IV
5′	71	48	53	7
10′	125	55	57	14
15′	168	61	59	19
20′	205	64	61	23
25′	230	66	63	26
30′	241	67	63	29
35′	246	66	63	32
40′	249	67	64	34

Tabelle 12.

Gesamtvolumen: 2,2 ccm
Temperatur: 36°
Oeffnungszeit: 2 Minuten
Puffer: 0,2-m $NaHCO_3$ (0,5 ccm für jeden Ansatz)

Zeit	20 mg Muskp. 2 mg Methgl. 3 mg G·SH 1,8 mg Asc.	20 mg Muskp. — 3 mg G·SH 1,8 mg Asc.	20 mg Muskp. — — 1,8 mg Asc.	20 mg Muskp. 2 mg Methgl. — 1,8 mg Asc.
Min.	V	VI	VII	VIII
5′	88	53	51	55
10′	143	54	55	72
15′	199	56	59	83
20′	240	60	61	92
25′	270	60	63	98
30′	283	60	63	105
35′	289	60	64	110
40′	291	62	65	115

Man erkennt beim Vergleich der Ansätze mit und ohne Ascorbinsäure eine Erhöhung der Milchsäurebildung im ersteren Falle. Noch deutlicher wird dies, wenn man zur Korrektion die CO_2-Entwicklung der Eigensubstrate (Spalten II Tabelle 11 und

VI Tabelle 12) und der nicht-enzymatischen Milchsäurebildung (Spalte IV Tabelle 14) von den entsprechenden Werten der Spalten I und V in Abzug bringt. Auf diese Weise wurden die Zahlen der Tabelle 13 erhalten.

Tabelle 13.

	Ohne Ascorbinsäure	Mit Ascorbinsäure	
Zeit	I — (II + IV)	V — (VI + IV)	Diff.
5′	16	28	12
10′	56	75	19
15′	88	124	36
20′	118	157	39
25′	138	184	46
30′	145	194	49
35′	148	197	49
40′	148	195	47

In ähnlicher Weise gelang es, bei Leberextrakt mit Ascorbinsäure eine Beschleunigung der Milchsäurebildung zu bewirken (vgl. Tabelle 4). Als Enzym diente in diesem Falle frischer Leberextrakt, der nach dem Zentrifugieren ohne weitere Reinigung zwecks Zerstörung des darin enthaltenen HS·Glutathions vier Stunden lang mit Sauerstoff durchperlt wurde. In dem Ansatz von 0,5 ccm Leberextrakt, 0,5 ccm Pufferlösung, 2 mg Methylglyoxal und 3 mg Glutathion bewirkten 1,8 mg Ascorbinsäure eine rund 50%ige „Aktivitäts-Steigerung". Es erwies sich jedoch als unmöglich, diese Beobachtung auch an gereinigten Fermentpräparaten aus Leber zu machen. Zur Verwendung kamen hierbei frische Lösungen, aus denen mit Acetatpuffer die Hauptmenge der begleitenden inaktiven Eiweisskörper ausgefällt war, und Dauerpräparate, die durch ein- oder zweimalige Fällung mit Aceton und Alkohol hieraus hergestellt wurden. Allerdings wurde bei diesen Messungen ein anderes Präparat des Methylglyoxals und der Ascorbinsäure benutzt. Während im ersten Falle synthetische Ascorbinsäure (Redoxon, Hoffmann-La Roche) und Methylglyoxal aus Dioxyaceton verwandt wurde, diente im zweiten Falle als Ascorbinsäure-Präparat Mercks Cebion und als Substrat Methylglyoxal aus Aceton.

Tabelle 14.

Ges.-Vol. 2,5 ccm 2 Min. Oeff.-Zeit Temp. 30°	0,5 ccm Puffer (0,2-m $NaHCO_3$) 5% CO_2 2 mg Methylglyoxal 2 mg Glutathion 1,8 mg Ascorbinsäure					
	„gereinigter" Leberextrakt		„1. Fällung"		zweimal umgefällt	
Zeit	ohne	mit	ohne Ascorbinsäure	mit	ohne	mit
10′	97	85	64	58	195	181
20′	159	148	120	103	368	357
30′	211	203	159	145	472	450
40′	267	245	195	178	480	450

Tabelle 15.

2,5 ccm 5% CO_2 30° 2′ Oeff.-Z.	Nieren-Extrakt (Schwein) 2 mg Methylglyoxal 2 mg Glutathion 1,5 mg Ascorbinsäure	
Zeit	ohne	mit
10′	135	139
20′	226	235
30′	335	347
40′	409	445
50′	427	458
60′	430	460 cmm CO_2

Tabelle 16.

2,5 ccm 5% CO_2 30° 2′ Oeff.-Z.	Nierenextrakt (Schwein) 3 Std. Sauerstoff 2 mg Methylglyoxal 2 mg Glutathion 1,5 mg Ascorbinsäure	
Zeit	ohne	mit
10′	138	150
20′	239	263
30′	344	383
45′	439	490
60′	454	501 cmm CO_2

Wie man sieht (Tabelle 14), handelt es sich hier eher um eine Hemmung als um eine Förderung der Milchsäurebildung. Möglicherweise spielt ein Hemmungsstoff eine Rolle, der mit dem aus natürlichem Material isolierten Cebion eingeschleppt worden ist. Vielleicht ist an dem Zustandekommen dieser Erscheinungen auch der natürliche Cu-Gehalt der Glyoxalase beteiligt. Auffällig ist jedenfalls folgende Beobachtung: Nierenextrakt erfährt durch Ascorbinsäure eine etwa 10%ige Steigerung seiner Wirksamkeit (Tab. 15 und 16). Nach Behandlung mit m/5000-$CuSO_4$ ist die Aktivität stark abgesunken, und zwar in den Ansätzen mit Ascorbinsäure deutlich stärker als in denen ohne diese (Tabelle 17). Eine Erklärung kann hierfür nicht gegeben werden.

Tabelle 17.

2,5 ccm 17 % CO_2 30° 4′ Oeff.-Zeit	Nieren-Extrakt (Schwein), 0,5 ccm mit m/5000 $CuSO_4$			
	0,5 ccm Puffer 2 mg Methylglyoxal 2 mg Glutathion 1,5 mg Ascorbinsäure		Nach der Korrektion für Eigensubstrat und nicht-enzymatische MS-Bildung	
Zeit	ohne	mit	ohne	mit
10′	9	7	2	0
20′	29	17	14	6
30′	45	29	31	15
40′	65	41	48	24
50′	86	57	66	37
60′	108	70	85	47
70′	122	83	97	58
80′	137	106	110	73 ccm CO_2

Vergleichende Aktivitäts-Bestimmungen.

Da für zahlreiches Material der Flavingehalt aus der Literatur bekannt war, wurde eine Bestimmung der Glyoxalase-Aktivität unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt. Hierbei ist es vor allem wichtig, sich von dem wechselnden Glutathiongehalt der verschiedenen Materialien unabhängig zu machen. Man kann dies am einfachsten dadurch erreichen, dass man allen Ansätzen die gleiche, verhältnismässig grosse Menge Glutathion zusetzt.

Wie nämlich schon *Platt* und *Schroeder* an Acetonhefe gezeigt haben, besteht eine Abhängigkeit der Aktivität von der G·SH-Konzentration nur in Lösungen, die verdünnter als etwa $2 \cdot 10^{-3}$-molar sind; eine gradlinige Abhängigkeit gar fand sich nur bei Konzentrationen unter $1 \cdot 10^{-3}$-molar.

Bei den höheren Gehalten (2- bis $5 \cdot 10^{-3}$-molar) ist die Geschwindigkeit vollkommen unabhängig von der Glutathionmenge. Da aber der G·SH-Gehalt der lebenden Gewebe immer sehr klein ist, kann man durch Zusatz von Glutathion-Lösungen zu Fermentansätzen gelangen, die bezüglich des G·SH maximal aktiviert sind. Die Wirksamkeit ist in diesen Fällen durch die Menge der übrigen Komponenten des Systems begrenzt und kann, in erster Annäherung wenigstens, als Mass für Menge gelten. Es wurde mit einer Konzentration von 2,5 mg Glutathion

in 2 cm^3, das heisst mit einer rund $4 \cdot 10^{-3}$-molaren Lösung gearbeitet. Der obere Rand des konzentrationsunabhängigen Gebietes wurde gewählt, um zu vermeiden, dass man nach einer etwaigen teilweisen Oxydation des G · SH zu leicht in den konzentrations-abhängigen Bereich gerät.

Um allfällige Unterschiede der Löslichkeit auszuschalten, wurden nicht Gewebsextrakte, sondern Gewebebrei angewandt, der durch Zerreiben auf grober Glasfilternutsche hergestellt wurde, wodurch die Gleichförmigkeit der Suspensionen gewährleistet war.

Alle Messungen wurden bei $30^0 \pm 0{,}05^0$ ausgeführt. Das Gesamt-Volumen betrug 2,00 ccm. Die angewandten Konzentrationen waren für Methylglyoxal (1,75 mg) $1{,}2 \cdot 10^{-2}$-molar, für Glutathion (2,50 mg) $4{,}06 \cdot 10^{-3}$-molar, für Natrium-bicarbonat als Puffer 0,05-molar. Als Atmosphäre diente ein Gasgemisch aus 83 % Stickstoff und 17 % Kohlensäure.

Zur Berechnung der Aktivität wurde die nicht-enzymatische CO_2-Entwicklung gesondert bestimmt und in Abzug gebracht.

Die Messungen unter den obigen Bedingungen ergaben folgendes:

Tabelle 18.

Zeit	cmm CO_2
10′	3
20′	5
30′	8
40′	10
50′	13
60′	16
70′	18
80′	20
90′	22
100′	24
110′	26
120′	28

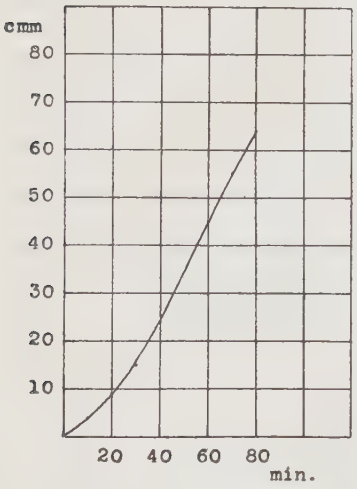
Die den folgenden Versuchen beigefügten Umsatzkurven wurden nach den in der oben geschilderten Weise korrigierten CO_2-Werten gezeichnet. Sie geben somit ein Bild der rein enzymatischen Milchsäurebildung. Die Numerierung der Kurven bezieht sich auf die im Text beschriebenen Verdünnungen.

Banane.

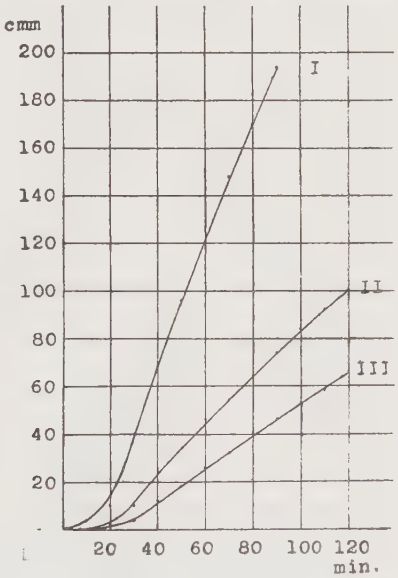
Frische geschälte Bananen werden unter scharfem Saugen auf der Nutsche zerdrückt. Der erhaltene zähflüssige Brei liess sich nur ungenau pipettieren, da immer gröbere und feinere Teilchen an der Pipettenwand hängen blieben. Deshalb wurden die Proben von einem halben Kubikzentimeter zur Kontrolle nachgewogen.

Spinat.

Die Blätter frischer marktfähiger Spinatpflanzen wurden mit destilliertem Wasser gut gereinigt und nach dem Abtrocknen ohne Stiele in der Reibschale gründlich zerkleinert. Beim weiteren Zerreiben auf der Nutsche erhielt man ohne Rückstand eine dunkelgrüne Flüssigkeit. Sie kam direkt (Lösung I) sowie in zweieinhalb- (Lösung II) und fünffacher (Lösung III) Verdünnung zur Verwendung.



Figur 13 Banane

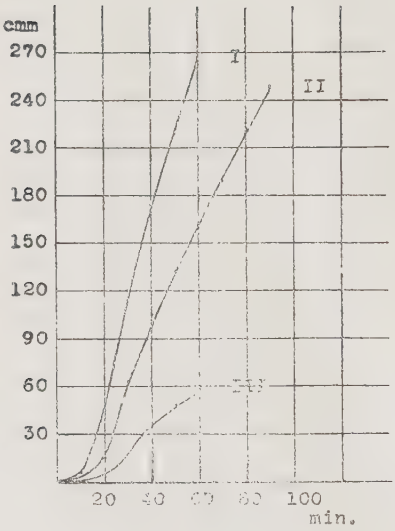


Figur 14 Spinat

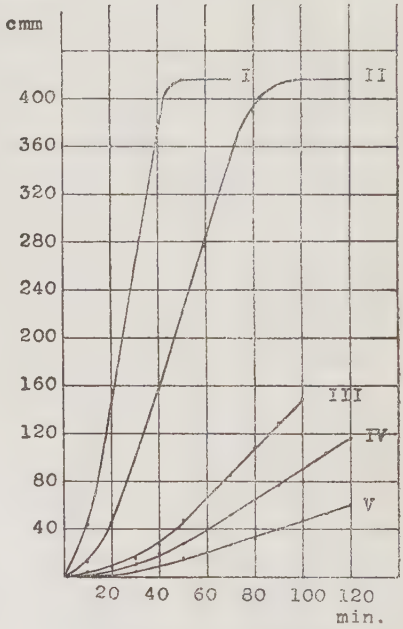
Hafer.

Junge Haferpflanzen von ungefähr 20 cm Länge werden etwa 3 cm vom Boden abgeschnitten, mit destilliertem Wasser gründlich abgespült und mit Filtrierpapier vom anhaftenden

Wasser befreit. Die lufttrocknen, aber nicht welken Sprosse wurden dann in einem grossen Mörser zerrieben, bis alles zu einem möglichst gleichförmigen Brei geworden war. Hiervon wurden einzelne Anteile auf der Nutsche unter Reiben und Pressen mit dem Pistill scharf abgesaugt. Als Rückstand blieben nur einige harte, helle Fasern auf dem Filter. Von der ursprünglichen Lösung (I) wurden durch Verdünnen mit Wasser zwei weitere hergestellt, welche die Hälfte (II) beziehungsweise ein Viertel (III) an Ferment enthielten.



Figur 15 Hafer



Figur 16 Rattenleber

Ratte, Leber.

Eine frisch entnommene Rattenleber von 4,5 g wurde auf der Nutsche zerdrückt. Von dem erhaltenen Brei wurde ein Gramm in 25 ccm Wasser suspendiert (Lösung I). Durch Verdünnen wurden hieraus weitere Lösungen hergestellt, und zwar waren Lösung II auf das Doppelte, Lösung III auf das Fünffache, IV auf das Zehnfache, V auf das Zwanzigfache verdünnt.

Dorsch, Gehirn.

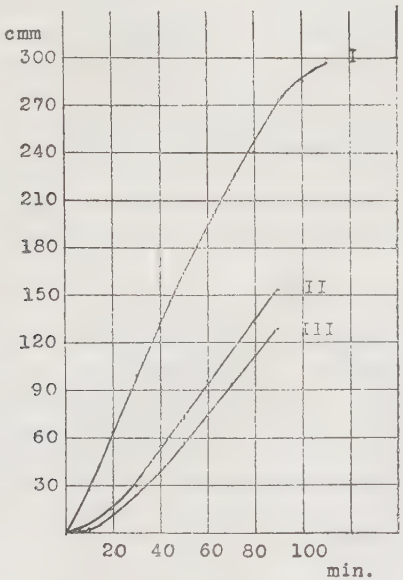
Die Fermentlösung enthielt 705 mg Gehirnbrei in 25 ccm Wasser suspendiert.

Dorsch, Leber.

Der auf der Nutsche hergestellte Leberbrei wurde in Wasser gelöst. 50 ccm Fermentlösung enthielten 2,000 g Leber.

Dorsch, Muskulatur.

7 g Muskulatur wurden auf der Nutsche zerkleinert und mit 20 ccm Wasser durchgespült. Die Lösung enthielt 350 mg Substanz im Kubikzentimeter.



Figur 17 Dorsch

I Muskulatur II Leber III Gehirn

Eigelb, Eiklar.

Von einem frischen Hühnerei wurden 2 g Dotter in 50 ccm, und von Eiklar 2 g in 25 ccm Wasser gelöst. Die Messungen wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt wie bei den anderen Versuchen dieses Abschnittes.

Tabelle 19.

Zeit	20 mg Eigelb Puffer; G·SH		40 mg Eiklar Puffer; G·SH		Methgl. alle Zus. ohne Ferm.
	Methgl.	—	Methgl.	—	
10′	19	23	9	8	3
30′	26	27	14	9	8
60′	34	27	21	9	16
120′	47	27	36	9	28
120′—10′	28	4	27	1	25
cmm CO_2 (enzymatisch)	—1		+1		
Flavingehalt:	4000—5500		2800—4500 γ/kg		

Platt und *Schroeder*[66]) behaupteten, dass die Methode der maximalen G·SH-Aktivierung zu Aktivitätsbestimmungen der Glyoxalase nicht geeignet sei, weil bei den hohen hierzu notwendigen Konzentrationen das Enzym-Zeitgesetz nicht mehr gilt, insofern, als bei grösseren Fermentmengen eine kleinere Wirksamkeit gefunden wird, als bei einem gradlinigen Verhältnis: Fermentkonzentration — Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten wäre. Aus diesem Grunde wurden bei den meisten vergleichenden Bestimmungen Messungen mit verschiedenen Enzymmengen gemacht.

Wie ein Vergleich der bei den einzelnen Konzentrationen gefundenen Aktivitäten erkennen lässt, hat diese Einschränkung unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keine Gültigkeit. Es wurden innerhalb der Fehlergrenze (10%) unabhängig von der angewandten Enzymmenge, dieselben Aktivitäten ermittelt. Lediglich bei Spinat wiesen die Zahlen einen in der angegebenen Richtung liegenden Gang auf: die kleineren Fermentmengen waren verhältnismässig wirksamer.

10) Glyoxalase und Flavinenzym.

In zwei Fällen konnte eine Beschleunigung der Milchsäurebildung durch Flavinenzym beobachtet werden, beide Male an Meerschweinchenmuskel.

In Kontrollansätzen wurde der Einfluss des gelben Ferments auf die nicht-enzymatische Kohlensäure-Entwicklung geprüft (Tabelle 21).

Tabelle 20.

0,5 ccm P. 5% CO_2 30° Vol. 2,2 2' Oeff.-Z.	20 mg Muskelpulver (Anh.) 1,7 mg Methgl. 0,4 mg G·SH 0,25 mg FE	— — —	Methgl. G·SH —	enzymatische CO_2-Entwicklung ohne Flav.-Enz. II—III—IV	mit Flav.-Enz. I—III—IV
Zeit	I	II	III	IV	V	VI
5'	35	24	22	7	—	6
10'	57	45	30	13	2	14
15'	78	65	33	16	16	29
20'	88	81	35	19	27	34
25'	104	94	36	21	37	47
30'	114	104	37	23	44	54

Es zeigt sich hier (auch bei Abwesenheit von Muskelpulver) mit Flavinenzym allein eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit gegenüber dem Ansatz ohne Flavinenzym, also eine Glyoxalasewirkung (vergleiche den folgenden Abschnitt).

Bemerkenswerterweise überschreitet in der ersten Viertelstunde die „Aktivierung" (Differenz der Spalten V und VI) das Ausmass der Glyoxalasewirkung des gelben Fermentes (Tab. 21 Spalte III), obwohl im zweiten Versuch die doppelte Flavinenzymmenge angewandt wurde.

Tabelle 21.

36° 5% CO_2 2,2 5cm 2' Oeff.-Z.	0,5 ccm Puffer 1,7 mg Methgl. 0.4 mg G·SH 0,5 mg Flav.-E.	—	Differenz I—II
Zeit	I	II	III
5'	10	7	3
10'	19	13	6
15'	27	16	9
20'	32	19	13
25'	39	21	18
30'	40	23	17 cmm CO_2

11) Glyoxalase-Aktivität des Gelben Fermentes.

Um sicher zu sein, dass die im manometrischen Versuch mit Flavinenzym erzielte Vermehrung der CO_2-Entwicklung auch tatsächlich auf einer erhöhten Milchsäurebildung beruht, wurde in präparativen Ansätzen die gebildete Milchsäure als Zinksalz isoliert.

In zwei 2 l-Erlenmeyerkolben wurden je 4,00 g Natriumbikarbonat, 1,389 g Methylglyoxal, 49,8 mg Glutathion in 1470 ccm Wasser gelöst. Die Ansätze wurden unter einer Stickstoff-Kohlensäure-Atmosphäre bei 37° im Brutschrank aufbewahrt. Das Gasgemisch enthielt 20% CO_2 und wurde durch Vermischen der den Bomben entnommenen Gase im Verhältnis 1 : 4 hergestellt. Die Strömungsgeschwindigkeiten wurden manometrisch kontrolliert und die richtige Zusammensetzung des Gemisches durch die Analyse geprüft. Nachdem alle Luft verdrängt war und die Lösung sich temperiert hatte, wurde das Flavinenzym in sechs- bis zehnstündigen Abständen dem einen der beiden Ansätze zugefügt. Im Ganzen wurden 500 mg Flavinenzym zugesetzt, und zwar jedesmal 100 mg in 10 ccm gelöst; dem anderen Ansatz wurden dann 10 ccm Wasser hinzugefügt. Von Zeit zu Zeit wurde in beiden Gefässen die Methylglyoxal-Konzentration durch Titration ermittelt. Sie betrug am Beginn (Augenblick des ersten Flavinenzym-Zusatzes) 17,5 mg in 20 ccm.

Nachdem im fermenthaltigen Ansatz das Methylglyoxal bis auf fast ein Siebentel verschwunden war (2,54 mg in 20 ccm), wurde der Versuch nach insgesamt 52 Stunden unterbrochen. Es wurden 100 ccm konzentrierter Salzsäure zugesetzt und das nicht verbrauchte Methylglyoxal mit Dinitrophenylhydrazin ausgefällt. Das im Vakuum (bei 50° und 30—40 mm Hg) eingeengte Filtrat wurde durch vorsichtigen Zusatz von Natronlauge vom überschüssigen Dinitrophenylhydrazin befreit und nach dem Sättigen mit Ammonsulfat und Ansäuern mit konzentrierter Phosphorsäure mit Aether extrahiert. Der in Wasser aufgenommene ätherische Auszug wurde auf dem Wasserbade mit überschüssigem Bleicarbonat behandelt und nach dem Erkalten der Ueberschuss und die unlöslichen Bleisalze durch Filtration abgetrennt. Das im Filtrat befindliche milchsaure Blei wurde mit Schwefelwasserstoff zerlegt, der Bleisulfidniederschlag abgenutscht, getrocknet und zur Wägung gebracht. Das von H_2S befreite Filtrat wurde mit Zinkcarbonat auf dem siedenden Wasserbade erhitzt, nach dem Filtrieren durch Aufkochen mit einer Spatelspitze Tierkohle entfärbt und schliesslich auf dem

Wasserbad bis zur beginnenden Kristallisation langsam eingedampft. Das durch Zusatz von Alkohol vollständig gefällte milchsaure Zink wurde mit Alkohol und Aether gewaschen und an der Luft getrocknet.

	ohne gelbem Ferment	mit Ferment
Methylglyoxal: zu Beginn	1,265 g	
am Ende	1,037 g	0,170 g
verbraucht	0,228 g	1,095 g
Dem Verbrauch entspricht	285 mg	1,370 g MS
PbS (gef.)	0,3468 g	1,7837 g
entspricht an MS	263 mg	1,344 g
erhalten als Zinksalz	0,3811 g	1,9882 g
entspricht an MS	231 mg	1,204 g
Ausbeute: berechnet aus PbS	92 %	98 %
berechnet aus Zinksalz	81 %	88 %

Das Zinksalz enthielt 28,95 beziehungsweise 28,97 % Zn*); berechnet für $Zn(CH_3 \cdot CHOH \cdot COO)_2$, $3\,H_2O$: 28,99 %. Wie man sieht, wurde in dem Ansatz mit gelbem Ferment etwa fünfmal so viel Milchsäure gebildet wie in dem ohne.

12) Hemmung durch Schwermetalle.

Tabelle 22.

36° 5 % CO_2 2,5 ccm G·V	0,5 ccm Pufferlösung 2 mg Methylglyoxal 1 mg Glutathion 1 mg Ascorbinsäure 1 mg Adrenalin 2 mg gelbes Ferment		
	—	3 γ Cu··	0,3 γ Cu·· 1,2 γ Zn·· 2,5 γ Fe··
10′	15	10	11
20′	36	22	28
30′	54	33	42
40′	70	43	55
50′	81	53	64
60′	90	60	74

Bei diesen Messungen, zu denen ebenfalls das gelbe Ferment als Glyoxalase diente, wurde das Methylglyoxal eingekippt. Enzym und Glutathion unterlagen währenddessen bei Gegenwart

*) Bestimmt als anthranilsaures Zink nach *Fank* und *Ditt*. Z. f. analyt. Ch. 91, 334 (1934).

von Ascorbinsäure und Adrenalin der Einwirkung des Schwermetalls. Die molaren Konzentrationen waren für Glutathion $1{,}3 \cdot 10^{-3}$, für Ascorbinsäure $2{,}3 \cdot 10^{-3}$, für Adrenalin $2{,}2 \cdot 10^{-3}$. Die Konzentration an Cu-Ionen betrug 10^{-6} bis 10^{-5} mol/l, die der Eisen- und Zinkionen 10^{-4} beziehungsweise 10^{-5} mol/l.

Die Metalle wurden in Form ihrer Sulfate verwendet.

Zink hemmte auch in hundertmal grösseren Konzentrationen nicht. Auf die nicht-enzymatische Milchsäurebildung übten die Metallsalze während der Dauer der Messung keinen erkennbaren Einfluss aus.

13) Wirkung der Co-Zymase.

Keine Aktivierung der Leberglyoxalase.

Das Fermentpräparat für diesen Versuch war eine Acetonfällung aus gereinigtem Leberextrakt, die durch Anrühren mit Wasser in Lösung gebracht worden war. Die Lösung enthielt 1 mg Substanz im Kubikzentimeter. Als Co-Zymase diente ein hochgereinigtes Präparat, ACo 350000*). Es wurde eine Lösung hergestellt, die in 5 ccm 0,49 mg Co-Zymase enthielt.

Tabelle 23.

30° 17% CO_2 2,5 ccm GV	0,5 ccm Fermentlösung 0,5 ccm Pufferlösung 2 mg Methylglyoxalase 1 mg Glutathion	
	—	0,5 ccm Co-Z 17 Co
Zeit	I	II
10′	33	34
20′	68	69
30′	107	108
40′	149	151
50′	187	186
60′	229	226
70′	265	261
80′	299	295

Hemmung durch Co-Zymase.

Der mit gelbem Ferment als Glyoxalase in entsprechender Weise durchgeführte Versuch ergab eine ausgesprochene Hem-

*) Es wurde dankenswerter Weise von Herrn Professor *H. v. Euler*, Stockholm, zur Verfügung gestellt.

mung. Die Co-Zymaselösung enthielt in diesem Falle 0,51 mg in 5 ccm, die Ansätze mit Co-Zymase enthielten rund 18 Co-Einheiten.

In all diesen Versuchen wurde das Ferment eingekippt.

Tabelle 24.

36° 5% CO_2 Ges.Vol. 2,5 keine Oeff.-Z.	0,5 ccm Pufferlösung (0,2-m $NaHCO_3$) 2,0 mg Methylglyoxal 1,0 mg Glutathion		
	—	2,0 mg gelbes Ferment	
		—	0,051 mg Co-Z. 18 Co.
Zeit	I	II	III
10′	8	15	8
20′	16	36	18
30′	20	54	28
40′	24	70	31
50′	27	81	38
60′	30	90	43

Wie in besonderen Ansätzen festgestellt wurde, hat die Co-Zymase auf die Grösse der nicht-enzymatischen Milchsäurebildung keinen Einfluss. Zum bequemeren Vergleich wurden die Zahlen der obigen Tabelle 24 nach Abzug der nicht-enzymatischen CO_2-Mengen in Tabelle 25 zusammengestellt. Man erkennt den beträchtlich hemmenden Einfluss der Co-Zymase, der zu Beginn des Versuchs am grössten ist und 100% erreicht.

Tabelle 25.

Zeit	enzymatische CO_2-Bildung	
	ohne Co-Zym.	mit Co-Zym.
10′	7	0
20′	20	2
30′	34	6
40′	46	7
50′	54	11
60′	60	13 cmm CO_2

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemischen Institut der Universität Marburg auf Anregung und unter Leitung von Herrn Dozent Dr. habil. *Theodor Bersin* ausgeführt. Sie wurde im Dezember 1934 begonnen und im Juni 1936 experimentell abgeschlossen.

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Dr. *Bersin,* für sein stetes und reges Interesse an der Arbeit, für seine gütige Unterstützung und seinen mir reichlich erteilten Rat meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für die Bereitstellung von Apparaturen ebenfalls in hohem Masse zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Am 14. November 1908 wurde ich, *Helmut Otto Nafziger*, als Sohn des Ingenieurs Friedrich Albert Nafziger und dessen Ehefrau Isabella geb. Führer zu Köln-Kalk geboren. Ich bin evangelischer Konfession, habe die deutsche Staatsangehörigkeit und bin arischer Abstammung.

Nach Absolvierung der Grundschule besuchte ich vom April 1919 das Realgymnasium zu Köln-Deutz, wo ich Ostern 1928 das Reifezeugnis erhielt. Vom Sommer-Semester 1928 ab studierte ich an den Universitäten zu Bonn, Graz, Köln und Marburg Biologie und Chemie. Nachdem ich in Köln den ersten und in Marburg den zweiten Teil des chemischen Verbandsexamens bestanden hatte, war ich vom Dezember 1934 bis zum Juni 1936 unter der Leitung von Herrn Dozenten Dr. phil. habil. *Th. Bersin* mit der Durchführung dieser Arbeit beschäftigt. Vom Juli 1936 ab assistierte ich bei Herrn Dozenten Dr. med. habil. *Joachim Lauber*, seit dem 1. Juli 1937 bin ich Assistent bei Herrn Dozenten Dr. phil. habil. *Theodor Bersin*.

Meine akademischen Lehrer waren in Bonn: *Cloos, Heidermanns, Pfeiffer, Quast;* in Graz: *Fritsch, Kubart, Mauli, Meixner. Storch, Skrabal;* in Köln: *André, Bresslau, Dacapsky, Harnisch, Kisch, Reisinger, Rinkel, Sierp, Veit, Wintgen;* in Marburg: *Bersin, Criegee, Dittler, Grüneisen, Meerwein.* Ihnen allen sage ich meinen herzlichsten Dank.